

Aus der **Klinik für Anaesthesiologie**
Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler



NACHWEISMETHODEN UND NORMWERTE FÜR ISOAGGLUTININE BEIM MENSCHEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Andrea Hennig geb. Weingandt
aus Vilshofen an der Donau
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Spannagl
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Stephan Lederer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Georg Wittmann
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2016

für meine Eltern

Regina und Peter Weingandt

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Historisches – die Entdeckung der Blutgruppen	9
1.2 Die Bedeutung der Isoagglutinine	10
1.3 Genetik und Molekularbiologie.....	11
1.3.1 Das Immunsystem.....	11
1.3.2 Antikörpergenese.....	12
1.3.3 Genetik der Blutgruppenantigene	13
1.3.4 Blutgruppe A1 und A2.....	14
1.3.5 Antikörperstruktur.....	14
1.3.6 Antikörperarten.....	15
1.4 Isoagglutinine – Surrogatmarker für die Immunfunktion?	17
1.5 Isoagglutinine: Bekannte Unterschiede.....	18
1.5.1 Männer / Frauen	18
1.5.2 Änderung der Ak-Titer mit steigendem Lebensalter.....	19
1.6 Neue Bedeutung bei Organ- und Stammzelltransplantation.....	19
1.7 Nachweismethoden für Isoagglutinine	21
1.7.1 Hämagglutination	21
1.7.2 ELISA.....	21
1.7.3 Durchflusszytometrie.....	22
1.7.4 Oberflächenplasmonresonanz	22
1.8 Normwerte für Isoagglutinine.....	22
1.9 Hypothesen und Paralleluntersuchungen	23
1.10 Fragestellung	25
1.10.1 Methodenvergleich.....	25
1.10.2 Normwertbestimmung an größeren Kollektiven	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Untersuchungsmaterial.....	27
2.1.1 Blutproben.....	27
2.1.2 Labormaterialien	28
2.1.3 Gelkarten.....	30
2.1.4 Laborgeräte.....	30
2.2 Methodik	31
2.2.1 NaCl-Röhrchen-Nachweis	31
2.2.2 Gelkarten-Nachweis	32
2.2.3 Nachweis im Neutr-AB® II-Röhrchen.....	34
2.2.4 Auswertungsbogen	34
2.2.5 Statistische Auswertung.....	35
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Vergleich der Nachweismethoden NaCl-Röhrchen vs. NaCl-Gelkarte.....	37
3.1.1 Detaillierte Ergebnisbeschreibung	38

3.1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse des Methodenvergleichs	40
3.2	Übersicht über die ermittelten Normwerte für Isoagglutinititer.....	41
3.2.1	Normwerte des Kollektivs AB0	42
3.2.2	Normwerte des Kollektivs „Patient“	44
3.2.3	Normwerte des Kollektivs „Spender“	46
3.2.4	Normwerte des Kollektivs „Alt“	48
3.2.5	Normwerte des Kollektivs „Jung“	50
3.3	Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse.....	52
4	Diskussion.....	53
4.1	Methodenvergleich.....	53
4.1.1	Kein Unterschied der Sensitivität von NaCl-RT und NaCl-GT	53
4.1.2	Unterschiede der beiden Nachweismethoden.....	53
4.2	Neutr-AB® II: Methodendiskussion	55
4.3	Normwerte	56
4.3.1	Blutgruppe A1	57
4.3.2	Blutgruppe A2.....	57
4.3.3	Blutgruppe B	57
4.3.4	Blutgruppe 0	57
4.3.5	Interpretation	58
4.3.6	Klinische Anwendung der Isoagglutinititer	58
4.3.7	„Gute“ und „schlechte“ Blutgruppen: Was steckt dahinter?	61
4.4	Fazit und Ausblick	62
4.4.1	Zusammenfassung Methodenvergleich.....	63
4.4.2	Zusammenfassung Normwerte	63
5	Literatur.....	65
6	Anhang Tabellenwerk Rohdaten	71
6.1	Einteilung der Rohdaten	71
6.2	NaCl-Röhrchen	79
6.3	NaCl-Karte.....	87
6.4	Neutr-AB® II.....	95
6.5	IgG-Coombs-Karte.....	103
7	Danksagung	115

ZUSAMMENFASSUNG

Isoagglutinine gewinnen aktuell wieder an Bedeutung als immunologischer Parameter im Vorfeld von Organ- oder Knochenmarktransplantationen, die aufgrund des Organmangels zunehmend und erfolgreich AB0-inkompatibel durchgeführt werden. Ein einheitliches Protokoll für die Durchführung AB0-inkompatibler Transplantationen und das postoperative Nachsorgeprogramm existiert bis heute allerdings nicht, die Verfahren von der Isoagglutininbestimmung bis hin zu den Verfahren der Titerreduktion und der postoperativen Überwachung der Titer sind je nach Land und transplantiertem Organ sehr heterogen.^{1,2}

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde deshalb im ersten Teil (Methodenvergleich) die Sensitivität von vier häufig in der Laborpraxis angewandten Nachweismethoden für Isoagglutinititer (NaCl-Röhrchentest, Neutr-AB® II-Röhrchentest, NaCl-Gelkartentest und IgG-Coombs-Gelkartentest) an einer hohen Anzahl von Plasmaprobe(n) (n=449) untersucht und statistisch ausgewertet. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden anhand dieser Daten Normwerte für Isoagglutinititer bei Erwachsenen berechnet und Normwerttabellen erstellt.

Es zeigte sich, dass bezüglich der Sensitivität der NaCl-Gelkartenmethode und der NaCl-Röhrchenmethode kein signifikanter Unterschied besteht. Weitere Unterschiede (z.B. Materialverbrauch, Objektivität, Rationalisierungsmöglichkeiten, Kosten) sprechen tendenziell zugunsten der Gelkartenmethode.

Da sich nach statistischer Auswertung der Daten je nach Blutgruppe (A1, A2, B, 0) und nach Untergruppe (alt/jung, männlich/weiblich, gesund/krank) fast immer eine Normalverteilung der Isoagglutinititer zeigte, war eine Normwertberechnung möglich. Diese wurde für das Gesamtkollektiv und für die Untergruppen durchgeführt. Eine Isoagglutinititeruntersuchung mit hohen Fallzahlen im Gesamtkollektiv (n>100 pro Methode und Blutgruppe) und statistisch aussagekräftigen Fallzahlen (n>40 pro Methode und Blutgruppe) in klinisch relevanten Untergruppen (alt/jung, männlich/weiblich, gesund/krank) mit Normwerterstellung an Erwachsenen war bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht veröffentlicht. Die relevantesten Ergebnisse (Titer der NaCl-Gelkartenmethode des Gesamtkollektivs AB0) wiesen dabei für Blutgruppe A1 einen Anti-B-Titer von 1/0-1 bis 1/128-256, für Blutgruppe A2 einen Anti-B-Titer von 1/2-4 bis 1/256-512, für Blutgruppe B einen Anti-A1-Titer von 1/2-4 bis 1/128-256 und einen Anti-A2-Titer von 1/0 bis 1/64-128, für Blutgruppe 0 einen Anti-A1-Titer von 1/2-8 bis 1/512-1024, einen Anti-A2-Titer von 1/0-2 bis 1/256-512 und einen Anti-B-Titer von 1/2-4 bis 1/256-512 auf.

Die vorgeschlagenen Normwerte dieser Arbeit können helfen, das Outcome und den Aufwand AB0-inkompatibler Transplantationen bei den verschiedenen Blutgruppen abzuschätzen und damit zur Entwicklung einheitlicher und effizienter Protokolle zur gezielten Reduzierung der Isoagglutinine im Vorfeld von Transplantationen beizutragen.

1 EINLEITUNG

1.1 HISTORISCHES – DIE ENTDECKUNG DER BLUTGRUPPEN

Die Entdeckung der Blutgruppen war ein langer Weg von Mythen und Legenden bis hin zum Nobelpreis. Seit der Entdeckung des Blutkreislaufes 1616 durch William Harvey wurde versucht, menschliches oder tierisches Blut direkt in die Venen des Empfängers zu transfundieren. Die meist fatalen Ergebnisse der Transfusionen folgten scheinbar keinem Schema und stellten die Ärzte jahrhundertlang vor ein Rätsel, obwohl von James Blundell 1825 einige erfolgreiche Transfusionen bei Wöchnerinnen mit lebensbedrohlichem postpartalem Blutverlust durchgeführt wurden.^{3,4} Gegen Ende des 19. Jahrhunderts näherte man sich der Lösung insofern, als dass erkannt wurde, dass menschliche Erythrozyten manchmal durch das Serum eines anderen Individuums zur Agglutination gebracht werden konnten. Allerdings war man zur damaligen Zeit der Meinung, diese Agglutination sei rein pathologischer Natur und infektionsbedingt.^{5,6}

Erst Karl Landsteiner, ein Wiener Pathologe, deckte im Jahr 1900 durch ein einfaches Experiment die Systematik des Agglutinationsverhaltens menschlichen Blutes auf. Er mischte sein eigenes Blutserum und das fünf weiterer Kollegen wechselweise mit seinen in Salzwasserlösung suspendierten Erythrozyten und denjenigen der Kollegen und beobachtete bei einigen Mischungen eine Agglutination, bei anderen jedoch nicht.^{5,7} Karl Landsteiner schloss daraus die Möglichkeit, dass ein tatsächlicher individueller Unterschied der menschlichen Sera und Erythrozyten die Ursache für die Agglutinationen sein könnte.⁶ Im folgenden Jahr entwickelte Landsteiner das AB0-System, bei dem es ihm gelang, mit nur zwei Antigenen (A und B) und zwei Antikörpern (Anti-A und Anti-B) die drei Hauptgruppen des menschlichen Blutgruppensystems zu beschreiben. Er konnte zeigen, dass Erythrozyten entweder das Oberflächenmerkmal A oder B aufweisen oder keines von beiden und dass das dazugehörige Serum keine Antikörper gegen die eigenen Antigene aufweist, das der Blutgruppe 0 allerdings Anti-A und Anti-B.^{6,8,9} Die vierte und seltenste Blutgruppe AB, welche im Serum weder Anti-A noch Anti-B enthält und auf den Erythrozyten beide Oberflächenmerkmale präsentiert, wurde ein Jahr später (1902) von Decastello und Sturli beschrieben.^{6,10} In **Abbildung 1** ist die Verteilung der Blutgruppen in Mitteleuropa gezeigt.

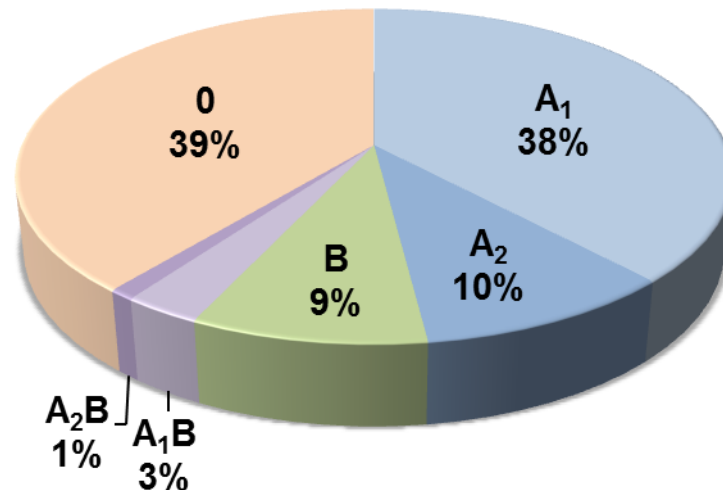


Abbildung 1. Verteilung der Blutgruppen in Mitteleuropa nach ¹¹

1.2 DIE BEDEUTUNG DER ISOAGGLUTININE

Diese Entdeckungen waren die Grundlage für die moderne klinische Praxis der Bluttransfusion. Trotz der entscheidenden Erkenntnis über das regelhafte Vorkommen der Antikörper gegen die Antigene A und B im menschlichen Serum dauerte es bis zum Ersten Weltkrieg, bis sich die Bluttransfusion als gängiges Verfahren in Form der direkten Übertragung vom Spender auf den Empfänger etablierte. 1930 bekam Karl Landsteiner den Nobelpreis für die Entdeckung der AB0-Gruppen. ^{6,12}

Doch sind die Blutgruppen nicht nur von großer Bedeutung im Hinblick auf die oft lebensrettende Maßnahme der Bluttransfusion. Die Entdeckung der A- und B-Antigene auf der Oberfläche der Erythrozyten brachte ihnen den naheliegenden Namen der „Blutgruppenantigene“ ein, tatsächlich sind sie aber noch mehr als das. Bald wurde erkannt, dass A- und B-Antigene bei vielen Menschen exokrin sezerniert werden und dadurch im Speichel und auf Schleimhäuten nachgewiesen werden können. ¹³⁻¹⁵ 1930 entdeckten Lehrs und Putkonen die erblich bedingte Fähigkeit, im Speichel Blutgruppenantigene zu sezernieren. ^{16,17} Sie klassifizierten die Menschen als „secretors“ und „non-secretors“ und fanden heraus, dass bei 80% der kaukasischen Bevölkerung die Eigenschaft des Sezernierens nach Mendelschen Regeln dominant vererbt wird. ⁶ Aber nicht nur im Speichel und auf Schleimhäuten lassen sich diese Antigene finden. Das Vorhandensein der Blutgruppenantigene auf Organen und Geweben macht das Wissen um sie unverzichtbar für die Organtransplantation, die bis heute vorwiegend auf der Grundlage der AB0-Kompatibilität praktiziert werden muss. In den letzten Jahren ist man dazu übergegangen, von Histo-Blutgruppenantigenen zu sprechen, um dem ubiquitären Vorhandensein dieser Oberflächenmerkmale im Körper Rechnung zu tragen. ^{18,19}

1.3 GENETIK UND MOLEKULARBIOLOGIE

1.3.1 DAS IMMUNSYSTEM

1.3.1.1 HISTORISCHES

Der Ausdruck „immun“ bedeutet wörtlich übersetzt „frei von Pflichten“ und „geschützt“. Er stammt aus dem Römischen Reich und wurde für Personen verwendet, die keine Steuern zahlen mussten. Später wurde diesem Ausdruck die heute wesentlich bekanntere Bedeutung zuteil, nämlich als man erkannte, dass Menschen nach bestimmten Erkrankungen vor einer erneuten Ansteckung geschützt waren. Bereits Thukydides erwähnt 430 v. Chr. eine große Seuche während des Peloponnesischen Krieges in Athen, die sogenannte „athenische Pest“, bei der die Patienten nach überlebter Ersterkrankung bei einer seltenen Zweiterkrankung nicht mehr an der Infektion starben.²⁰

Der englische Arzt Edward Jenner hat das Phänomen der Immunität erstmals systematisch angewandt. Er stellte 1798 durch Naturbeobachtung und Versuche an Gesunden fest, dass ein Kontakt mit den relativ harmlosen Kuhpocken vor einer Erkrankung mit den gefährlichen echten Pocken Schutz bot. Noch heute erinnern die Begriffe „Vakzination“ (lat. vacca, die Kuh) für die Schutzimpfung und „Vakzin“ für den Impfstoff an diese bedeutende Erkenntnis. Bedeutend vor allem auch deshalb, weil Edward Jenner noch nicht wusste, dass es sich bei den Erregern der Pocken und Kuhpocken um Viren handelte, die, ebenso wie die mikrobiellen Krankheitserreger, noch nicht entdeckt waren. Bakterien wurden erst Ende des 19. Jahrhunderts von Robert Koch in Berlin und Louis Pasteur in Paris als Krankheitserreger identifiziert.²⁰⁻²² Viren konnten sogar erst 1935 von Wendell Stanley anhand des Tabak-Mosaik-Virus nachgewiesen und beschrieben werden.²³

1.3.1.2 SELBST UND FREMD

Die Abwehr von Krankheitserregern wird bei Wirbeltieren vom Immunsystem übernommen, das in seiner Komplexität nur noch vom menschlichen Gehirn übertroffen wird. Es besteht aus einem angeborenen Immunsystem, wie es bei allen höheren Organismen zu finden ist, und einem erworbenen oder adaptiven Immunsystem, das nur den Wirbeltieren zur Verfügung steht.²⁰ Führt man sich vor Augen, dass der erwachsene Mensch aus ca. 10^{13} Körperzellen aufgebaut ist, aber auch 10^{14} Mikroorganismen - überwiegend Darmbakterien - beherbergt, wird deutlich, dass ein präzises Unterscheidungsvermögen des Immunsystems zwischen pathogenen Mikroorganismen und körpereigenen Strukturen von größter Bedeutung ist.^{20,24}

1.3.1.3 ANGEBORENE UND ERWORBENE IMMUNANTWORT

Zu den Komponenten der angeborenen Abwehr gehören die Hornhaut und der Säureschutzmantel der Haut zum Schutz der äußeren Oberfläche, sowie die Schleimhaut des Respirations- und Verdauungstraktes mit ihren zahlreichen antimikrobiellen Stoffen (z. B. Lysozym, Lactoferrin, β -Defensive) zum Schutz der inneren Oberfläche. Ebenso Teil der angeborenen Immunabwehr sind die Faktoren des Komplementsystems, die Alveolarmakrophagen der Lunge sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen).^{20,24,25} Die Komponenten der angeborenen Abwehr sind in ihrer Struktur vom Genom vorgegeben, ständig präsent und von Geburt an wirksam. Sie erkennen Oberflächenmoleküle, die für mikrobielle Erreger typisch sind und leiten Reaktionskaskaden ein, die zur Zerstörung oder zur Phagozytose des Erregers führen.²⁰

Die adaptive oder erworbene Immunantwort wird von bestimmten B- und T-Zelllymphozyten vermittelt. Dabei sind B-Zellen für die Antikörperbildung verantwortlich, infizierte Zellen werden von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen (Typ CD8) abgetötet, B-Zellen durch T-Helferzellen vom Typ CD4/Th2 aktiviert und Makrophagen von T-Helferzellen vom Typ CD4/Th1 aktiviert. Das Ingangkommen dieser spezifischen Immunabwehr nimmt einige Tage in Anspruch, in der Zwischenzeit werden die Erreger vom angeborenen Immunsystem bekämpft. Nach einer abgelaufenen adaptiven Immunantwort bleibt die längerfristige Immunität durch antigenspezifische langlebige B- und T-Zellen (sog. Gedächtniszellen) erhalten, die sich während der Immunantwort gebildet und vermehrt haben. Voraussetzung für die adaptive Immunantwort ist ein System aus zahlreichen Gensegmenten, die im Genom jedes einzelnen Lymphozyten durch alternatives Spleißen unterschiedlich zusammengesetzt werden und dadurch eine Vielzahl verschiedener Proteine kodieren können. Somit wird zu fast jeder möglichen Struktur eines Antigens ein passender Antikörper gebildet, der in Anwesenheit des spezifischen Antigens ausgewählt und in großer Menge vervielfältigt werden kann. Der Mensch kann so ca. 100 Milliarden unterschiedliche Antikörper bilden.^{20,24-26}

1.3.2 ANTIKÖRPERGENESE

Antigene sind Substanzen, die im Organismus eine spezifische Abwehrreaktion auslösen, wenn sie dem Immunsystem unbekannt, d. h. nicht Teil des immunologischen „Selbst“ des Körpers, sind.¹¹ Bei nahezu allen Blutgruppensubstanzen handelt es sich um entwicklungsgeschichtlich alte, in der Natur vorkommende Strukturen.^{11,20} In Bakterien, Viren, Parasiten, Tieren und Pflanzen lassen sich Kohlenhydratsubstanzen finden, die mit den Kohlenhydrat-Antigenen des AB0-Systems identisch sind oder zumindest eine Kreuzreaktion hervorrufen.⁵ Unser Körper bildet bei Kontakt mit diesen ubiquitär vorkommenden Antigenen Antikörper gegen dieselben, sofern er nicht selbst Träger dieser Antigene ist.^{5,11} Träger der Blutgruppe A1 und A2 besitzen somit Anti-

körper (sog. Isoagglutinine) gegen die Antigene der Blutgruppe B, Träger der Blutgruppe B Antikörper gegen die Antigene der Blutgruppen A1 und A2 und Träger der Blutgruppe 0 Antikörper gegen die Blutgruppen A1, A2 und B. Träger der Blutgruppe AB dagegen weisen keine Isoagglutinine auf, da das körpereigene Vorkommen der Antigene A und B dem Immunsystem eine Antikörperbildung gegen diese Antigene verbietet, auch wenn sie Bestandteil fremder Mikroorganismen sind.^{6,11} Manche Erreger (z. B. *Yersinia pestis*, Variola, *Helicobacter* und Norovirus) verbergen so ihre Oberflächenmoleküle vor der Immunabwehr des Wirts. Sie sind durch die sogenannte Molekulare Mimikry immunologisch „unsichtbar“. ²⁷ Untermauert wird diese Hypothese der Antikörpergenese durch eine Untersuchung der Gruppe Springer et al., die 1961 überzeugend nachweisen konnte, dass die normale Entwicklung von Anti-B-Antikörpern bei Küken in den ersten Lebenswochen durch die Haltung in absolut keimfreier Umgebung verhindert werden konnte.⁶

Wie präzise das Immunsystem Veränderungen dieser je nach Blutgruppe spezifischen Oberflächenstruktur der Erythrozyten wahrnimmt, wird beim natürlichen Alterungsprozess der Erythrozyten deutlich. Im Laufe ihrer Lebenszeit von ca. 120 Tagen verliert die Oberfläche der Erythrozyten durch Abnutzung immer mehr ihrer Glykoproteine und ändert somit die dem Immunsystem als „Selbst“ bekannte Struktur. Dies führt zu einer Opsonierung durch das Immunglobulin G (IgG) und in der Folge zur Lyse durch das Komplementsystem bzw. zur Phagozytose durch Makrophagen.²⁸

1.3.3 GENETIK DER BLUTGRUPPENANTIGENE

Bei den Blutgruppenantigenen der auf der Erythrozytenmembran lokalisierten Antigene des AB0-Systems handelt es sich chemisch betrachtet um Glykolipide. Auf dem Chromosom 9 befinden sich die Allele der Glykotransferasen, die die Antigene A1, A2, B und 0 bilden, auf Chromosom 19 das Allel der Glykotransferase, die das H-Antigen formt. Diese Transglykosylasen binden enzymatisch Zuckerketten an Proteine und sind somit für den Aufbau der Glykoproteinantigene des AB0-Systems ursächlich. An die Grundsubstanz (h) wird zunächst mithilfe der Fucosyltransferase (Chromosom 19) ein Molekül L-Fucose hinzugefügt. Somit ist die H-Substanz entstanden, die bei Trägern der Blutgruppe 0 das alleinige Antigen darstellt, da die Genorte für weitere Transferasen auf Chromosom 9 mit dem stummen Allel 0 besetzt sind. Bei Trägern der Blutgruppe A1 und A2 wird die H-Substanz durch die Acetylgalaktosaminyltransferase (Chromosom 9) um ein Molekül N-Acetylgalaktosamin ergänzt, bei Trägern der Blutgruppe B durch die Galaktosyltransferase (Chromosom 9) um ein Molekül D-Galaktose.^{11,29,30}

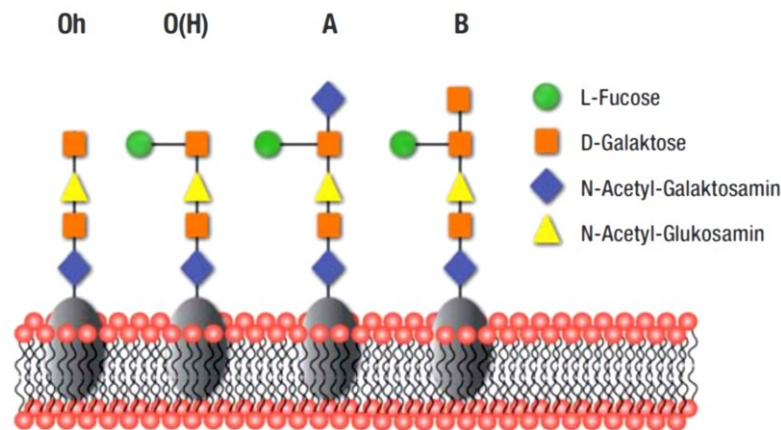


Abbildung 2. Schematische Darstellung des biochemischen Aufbaus der Blutgruppenantigene nach ³⁰

In **Abbildung 2** ist der Glykolipidaufbau der Blutgruppenantigene schematisch dargestellt. Von links nach rechts aufsteigend wird die Struktur des Oberflächenmerkmals Oh gezeigt, das jeder Erythrozyt beim Menschen aufweist, jeweils ergänzt um die Gruppen H, H und A oder H und B. Menschen mit der sehr seltenen Blutgruppe „Bombay“, also Oh, besitzen kein Antigen H auf ihrer Erythrozytenoberfläche und reagieren bei der Gabe von Fremdblut jeder AB0-Blutgruppe (sogar Blutgruppe 0!) mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Patienten mit der Blutgruppe Oh kann also ausschließlich Blut der eigenen, seltenen Blutgruppe Oh transfundiert werden. ³⁰

1.3.4 BLUTGRUPPE A1 UND A2

Bei der Blutgruppe A können die Untergruppen A1 und A2 unterschieden werden. Von den Individuen mit Blutgruppe A gehören ca. 80% der Untergruppe A1 an und ca. 20% der Untergruppe A2. Der Unterschied zwischen den beiden A-Blutgruppen besteht darin, dass die Erythrozyten der Blutgruppe A1 mehr A-Antigene auf ihrer Oberfläche tragen als die Erythrozyten der Blutgruppe A2, da deren N-Acetylgalaktosaminyltransferase deutlich aktiver ist. Desweiteren weisen die Erythrozyten der Blutgruppe A1 ein zusätzliches Glykoprotein-Antigen auf, das auf der Oberfläche der Erythrozyten der Blutgruppe A2 nicht vorhanden ist. Man kann dieses Antigen mithilfe eines Lektins (Anti-A1) nachweisen, das aus dem Samen einer in Indien wachsenden Futter-Leguminose (*Dolichus biflorus*) hergestellt wird. Individuen der Blutgruppe A2, die mit dem Antigen A1 in Kontakt kommen, können Antikörper dagegen bilden und bei erneutem Kontakt mit einem Blutprodukt der Gruppe A1 eine Antigen-Antikörper-Reaktion erleiden. ^{29,31}

1.3.5 ANTIKÖRPERSTRUKTUR

Antikörper sind Eiweiße mit β -Faltblattstruktur. Sie bestehen immer aus sogenannten kurzen Ketten, den L-Ketten (light chains), und den langen H-Ketten (heavy chains). Ein Antikörpermolekül besteht aus mindestens zwei identischen H-Ketten, sowie zwei identischen L-Ketten.

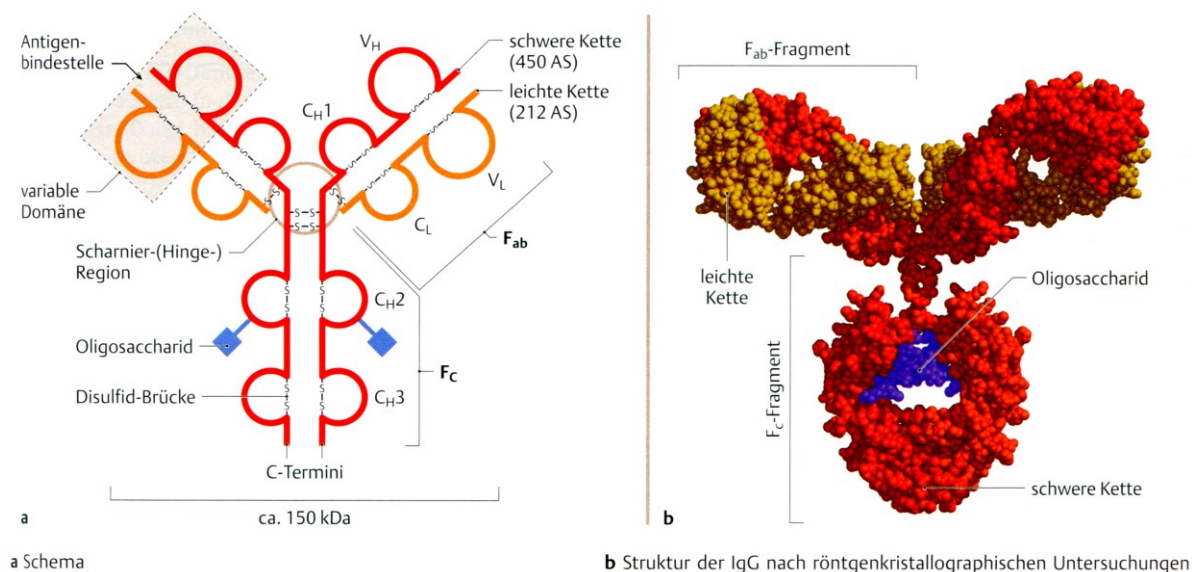


Abbildung 3. Schematische Darstellung eines IgG nach Duale Reihe Biochemie, S 703. ²⁰

H-Ketten und L-Ketten sind untereinander durch Disulfidbrücken verbunden, wobei die H-Ketten bestimmend für die Antikörperklasse sind. Die verschiedenen Antikörperklassen, die sogenannten Isotypen, werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Immunantwort gebildet: in frühen Stadien überwiegend IgM und etwas IgD, in späteren Stadien IgA, IgE und IgG. ²⁰

IgD, IgE und IgG liegen als Monomere vor, IgA als Dimere und IgM als Pentamere mit einem Molekulargewicht von ca. 950 kDa. ²⁰ In **Abbildung 3** ist ein IgG-Molekül schematisch sowie nach röntgenkristallographischen Untersuchungen dargestellt.

1.3.6 ANTIKÖRPERARTEN

1.3.6.1 REGULÄRE UND IRREGULÄRE ANTIKÖRPER

Die Isoagglutinine Anti-A und Anti-B werden als reguläre Antikörper bezeichnet, da es sich um Antikörper handelt, die bei nahezu allen Menschen blutgruppenkonträr im AB0-System vorhanden sind. Dem gegenübergestellt werden die sogenannten irregulären Antikörper der anderen Blutgruppensysteme, wie beispielsweise die Antikörper Anti-D des Rhesussystems oder die Anti-K-Antikörper des Kellsystems, die sich erst nach parenteralem Antigenkontakt bei einem Teil der so immunisierten Personen bilden. ¹¹

1.3.6.2 KOMPLETTE UND INKOMPLETTE ANTIKÖRPER

Erythrozyten halten unter physiologischen Bedingungen einen bestimmten Mindestabstand zueinander ein. Dieser physiologische Abstand ist durch eine besondere Eigenschaft der Erythrozyten bedingt. Erythrozyten weisen nämlich eine negative Membranladung auf, wodurch sich an ihrer Oberfläche positive Ionen anlagern. Diese positive Ionenschicht ist wiederum überwiegend

von negativen Ionen umlagert, so dass sich somit eine zweischichtige Ionenwolke ausbildet. Das elektrische Potential, das in der äußeren negativ geladenen Ionenwolke abfällt, wird als Zeta-Potential bezeichnet. Aus dem Zeta-Potential kann der Abstand zwischen Erythrozyten bestimmt werden, der unter physiologischen Bedingungen bis zu 30 nm beträgt. Anschaulich betrachtet stellt sich dieser Abstand ein, indem sich bei der Annäherung zweier Erythrozyten deren äußere negative Ionenwolke wegen der gleichpoligen Ladung abstößt, so dass sich als Abstand etwa die doppelte Dicke der Ionenwolke einstellt.^{11,32}

Als komplette Antikörper bezeichnet man Antikörper der Klasse IgM. Diese Antikörper sind mit einem Molekulargewicht von ca. 950 kDa so groß, dass sie den physiologischen Abstand zwischen zwei Erythrozyten überwinden können. Dadurch können IgM ohne abstandsmindernde Zusätze Erythrozyten agglutinieren.³³ Die Isoagglutinine Anti-A und Anti-B gehören größtenteils der Klasse IgM an und werden somit den kompletten Antikörpern zugeordnet.¹¹

Inkomplette Antikörper sind Antikörper der Klasse IgG. Sie sind mit einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa erheblich kleiner als IgM-Antikörper und können deshalb den physiologischen Abstand zwischen den Erythrozyten nicht ohne weiteres überwinden. Obwohl eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet, führt diese nicht zu einer sichtbaren Agglutination und kann somit nicht ohne eine spezielle Technik nachgewiesen werden. Zum Nachweis dieser Antikörper wird der sog. Coombs-Test (Antihumanglobulin-Test) eingesetzt.^{11,34}

Die Unterscheidung zwischen kompletten und inkompletten Antikörpern ist also zunächst eine rein labortechnische. In vivo findet trotz fehlender Erythrozytenagglutination durch IgG eine Zerstörung der Erythrozyten durch eine Antigen-Antikörperreaktion statt; auch bei IgM-Antikörpern ist die Erythrozytenzerstörung nicht primär durch die Agglutination, sondern durch die sehr viel schnellere Reaktion im Komplementsystem bedingt.¹¹

1.3.6.3 DER COOMBS-TEST

Um inkomplette Antikörper auf der Oberfläche von Erythrozyten nachzuweisen, bedient man sich des sog. Coombs-Tests. Dieser Test wurde bereits 1908 von Carlo Moreschi beschrieben, seine volle Bedeutung erkannte aber erst Sir Robin Coombs, der im Jahre 1945 die Anwendung des Testes anhand des inkompletten Antikörpers Anti-D beschrieb.^{34,35}

Beim Coombs-Test oder Antihumanglobulintest handelt es sich um einen Zweiphasentest. In der ersten Phase werden inkomplette Antikörper zu den Erythrozyten gegeben, die sich in einer Antigen-Antikörperreaktion an die Erythrozytenoberfläche anheften. Da es sich um inkomplette Antikörper handelt, können die Erythrozyten nicht spontan agglutinieren. Um eine sichtbare Agglutination zu erreichen, werden die Erythrozyten in der zweiten Phase mit einem Kaninchenserum versetzt, das Antikörper gegen menschliche Immunglobuline enthält. Dieses

sogenannte Coombs-Serum (Antihumanglobulin-Serum) wird z. B. durch Sensibilisierung von Kaninchen mit menschlichen Immunglobulinen hergestellt. Die Kaninchenantikörper gegen inkomplette Antikörper (IgG) reagieren mit den auf der Erythrozytenmembran angelagerten menschlichen IgG-Immunglobulinen, überbrücken den Abstand zwischen zwei Erythrozyten und führen zu einer sichtbaren Agglutination.^{10,11}

Zu unterscheiden sind hierbei der direkte und der indirekte Coombs-Test. Die Voraussetzung für den direkten Coombs-Test ist, dass die Erythrozyten bereits in vivo mit inkompletten Antikörpern beladen wurden, wodurch die erste Phase des Coombs-Tests hinfällig ist. Untersuchungsmaterial sind die Erythrozyten des Patienten, die nach mehrmaligem Waschen mit NaCl mit dem Antihumanglobulinserum versetzt werden. Von Bedeutung ist der direkte Coombs-Test zur Diagnose von Transfusionszwischenfällen, einer Autoimmunhämolyse oder eines Morbus hämolyticus neonatorum.¹¹

Der indirekte Coombs-Test oder auch Antikörpersuchtest weist freie irreguläre Antikörper der Klasse IgG im Serum nach. Er ist besonders wichtig bei der Blutgruppenbestimmung, der Schwangerenvorsorge und bei der Kreuzprobe vor einer Bluttransfusion, um frei zirkulierende Antikörper aufzuspüren, die sich gegen die Erythrozyten des Empfängers oder die Erythrozyten der Blutkonserve richten und diese zerstören würden. Er wird wie oben beschrieben zweiphasig durchgeführt.^{10,11}

1.4 ISOAGGLUTININE – SURROGATMARKER FÜR DIE IMMUNFUNKTION?

Hypothesen zur Korrelation zwischen der Funktion des Immunsystem und der Höhe von Isoagglutinintitern bzw. spezifischer Antikörpertiter wurden wiederholt in den letzten Jahrzehnten aufgestellt, die verfügbaren Arbeiten und Studien zeigen allerdings wenig belastbare und sehr heterogene Ergebnisse.

So kommen Czlonkowska et al. 1979 mittels Immunstimulationstests zu dem Ergebnis, dass sowohl die zellvermittelte als auch die humorale Immunantwort im Alter abnimmt.³⁶ Allerdings waren alle Probanden dieser Studie gesund und zeigten keinerlei Zeichen einer Immundefizienz, weswegen sich kein Zusammenhang zwischen einem niedrigen Antikörpertiter und einer verminderten Immunfunktion herstellen lässt.

Weiterhin wurden in der Vergangenheit einige Studien mit der Fragestellung durchgeführt, ob die individuelle Höhe der Isoagglutinintiter genetisch vorbestimmt ist oder vielmehr von der Umwelt, in der das Individuum aufwächst, abhängt. Redman et al. untersuchten die Isoagglutinintiter von Blutspendern mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft (asiatisch, afroamerikanisch, kaukasisch), die alle im Norden von London lebten.³⁷ Obwohl sich die höchsten Isoagglutininlevel bei afroamerikanischen weiblichen Blutspendern fanden, waren die Unterschiede in den

Gruppen doch nicht statistisch signifikant. Die Autoren sehen dies als Hinweis darauf, dass die Umwelt eine weit größere Rolle spielt als die ethnische Herkunft. Die zuvor von Grundbacher publizierten Daten über ethnische Unterschiede der Isoagglutinititer, die an Individuen in verschiedenen Teilen der Welt erhoben wurden³⁸, seien laut Redman et al. stärker durch die unterschiedlichen Umweltbedingungen als durch Rassenunterschiede beeinflusst.³⁷⁻³⁹

In einigen Studien von Grundbacher et al. und Rhodes et al. finden sich allerdings doch Hinweise auf einen genetischen Einfluss auf die Höhe der Isoagglutinititer.^{38,40,41} Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Frauen von Geburt an einen höheren Isoagglutinititer aufweisen als Männer und dieser während der fertilen Phase ihres Lebens besonders hoch ist (Näheres dazu unter 1.5.1).^{40,41} Washburn äußerte 1965 die Vermutung, dass die höheren Isoagglutininpiegel schon im Kleinkindalter die Ursache für die geringere Infektionsrate bei weiblichen Kleinkindern sei.⁴²

Neuere Studien zu diesem Thema waren bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht zu finden. Eine Funktion der Isoagglutinine als Surrogatmarker für die Immunfunktion kann aktuell bei den wenig belastbaren und sehr heterogenen Ergebnissen der aktuellen Publikationen nicht belegt werden.

1.5 ISOAGGLUTININE: BEKANNTE UNTERSCHIEDE

1.5.1 MÄNNER / FRAUEN

Mehrere groß angelegte Studien zeigten, dass IgM-Antikörper bei Frauen bis zum 15. Lebensjahr stetig ansteigen und bis zum 40. Lebensjahr konstant hoch bleiben, um dann bis zum 60. Lebensjahr wieder abzusinken und dann stabil zu bleiben.^{40,43} Der IgM-Level bei Männern bleibt ab dem 2. Lebensjahr stabil. Die IgM-Titer bei Mädchen und Frauen waren dabei immer signifikant höher als die der Jungen und Männer. Es wird deshalb vermutet, dass Frauen besonders während der fertilen Lebensphase einen hohen IgM-Antikörpertiter aufweisen, um während einer Schwangerschaft der gesteigerten Infektionsgefahr mit einer höheren Antikörperproduktion zu begegnen.^{40,43} Da bereits weibliche Kleinkinder einen höheren IgM-Titer als männliche Kleinkinder besitzen, könnte dies die Erklärung für die höhere Rate an Infektionskrankheiten bei männlichen Kindern darstellen.⁴² Ein bei Mädchen und Frauen signifikant höherer IgM-Titer wurde darüber hinaus speziell für Anti-A- / Anti-B-Isoagglutinine nachgewiesen.³⁸ Interessant ist hierbei auch die genetische Erklärung für die höheren IgM-Antikörper bei weiblichen Individuen: Grundbacher et al. und Rhodes et al. konnten zeigen, dass das X-Chromosom ein wichtiger Informationsträger für die Quantität der IgM-Antikörper im Blut darstellt.^{41,44} Frauen mit drei X-Chromosomen wiesen signifikant höhere Titer auf als Frauen mit zwei X-Chromosomen. Bei

Frauen mit XO-Gonosomensatz fand sich ein für XY-Männer typischer IgM-Antikörpertiter, bei XXY-Männern dagegen ein für XX-Frauen typischer Titer.⁴⁴

1.5.2 ÄNDERUNG DER AK-TITER MIT STEIGENDEM LEBENSALTER

Nach Erreichen eines Höhepunktes der Isoagglutinintiter mit ca. acht Jahren nimmt die Isoagglutininproduktion der Anti-A- / Anti-B-IgM-Antikörper mit zunehmendem Alter stetig ab, wobei der relative Anteil der inkompletten IgG-Antikörper steigt.⁴⁵ Laut Makinodan et al. beruht das Sinken der Antikörperproduktion im Alter auf einer allgemeinen Senkung der Teilungsrate und Differenzierung der Immunzellen im Laufe des Lebens.⁴⁶ Neuerdings mehrten sich allerdings die Hinweise, dass die Veränderungen des Immunsystems im Alter eher ein Zeichen steigender Dysregulation darstellen, als dass sie eine generelle Abnahme der Funktion widerspiegeln.^{47,48} Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ehemals dem Alterungsprozess zugeschriebene mangelnde Immunfunktionen mit anderen Faktoren wie Fehlernährung oder einer länger unentdeckt gebliebenen fortschreitenden Erkrankung assoziiert waren.^{47,48}

1.6 NEUE BEDEUTUNG BEI ORGAN- UND STAMMZELLTRANSPLANTATION

In den letzten Jahren rückten die Isoagglutinine wieder vermehrt ins Zentrum des Interesses der klinischen Forschung, nämlich als wichtiger Laborparameter im Vorfeld von Organ- oder Knochenmarktransplantationen, die aufgrund des Organmangels immer häufiger AB0-inkompatibel durchgeführt werden. Im Gegensatz zu Anti-A- und Anti-B-Antikörpern spielt das Vorhandensein von Nicht-A/B-Antikörpern (z. B. Rhesus, Kell, Duffy) eine geringere Rolle, da diese irregulären Antikörper sehr viel seltener sind und teilweise gar nicht, wie bei Rhesus, auf der Niere re-präsentiert sind. Abstossungen bei Anti-Fy- und Anti-Jk-Antikörpern kommen jedoch vor.^{49,50}

Erste Berichte über AB0-inkompatible Nierentransplantationen finden sich in den 1970er Jahren, als die Blutgruppenantigene des Spenderorgans als Ursache der Abstoßungsreaktion des Empfängers identifiziert werden konnten.^{49,51} Konsequenterweise wurden in den 1980er Jahren Versuche unternommen, diese Abstoßungsreaktion zu verhindern, z. B. in Form einer Immunadsorption der Isoagglutinine des Empfängers.⁵² Dennoch waren die Transplantationen wenig erfolgreich, da frühe Abstoßungsreaktionen und komplementvermittelte Kaskaden zur Zerstörung des Organs führten. In Europa wurde deshalb die Forschung zu AB0-inkompatiblen Transplantationen für die folgenden fünfzehn Jahre nahezu aufgegeben, während in Japan die Entwicklung eines Protokolls zur Immunsuppression und Desensibilisierung gegenüber AB0-inkompatiblen Organen weiter vorangetrieben wurde.⁴⁹ Dies hat vor allem kulturelle Gründe: Während in Europa die Organspende von Hirntoten weitgehend akzeptiert ist, wird diese in Japan wesentlich seltener durchgeführt, weil sich nur wenige Menschen bereiterklären, nach ihrem Tod Organe zu

spenden. Deshalb werden in Japan häufiger als in Europa Lebendspenden durchgeführt, die aber wegen des Organmangels oft AB0-inkompatibel sind.⁵³

Da nun auch in Europa die Organknappheit ein immer größer werdendes Problem darstellt, besteht hier ebenfalls das Interesse, die Lebendspende durch ein Überschreiten der einst unüberwindlichen immunologischen Grenze der AB0-Kompatibilität zu fördern.⁴⁹ Nachdem in Japan in den letzten zehn Jahren mit Erfolg AB0-inkompatible Nieren-, Leber-, Stammzell- und sogar Herztransplantationen durchgeführt wurden, setzt sich dieses Verfahren mit der Entwicklung erfolgreicher Protokolle zur Immunsuppression in den letzten Jahren auch in Europa durch. Ein Meilenstein in diesen Protokollen war 2001 die Einführung des monoklonalen Antikörpers Rituximab, der – einige Wochen vor der Transplantation bis zwölf Monate danach verabreicht – eine deutliche Reduktion der Isoagglutininintiter bewirkt und aufrechterhält.^{49,53}

Zusätzlich zur medikamentösen Immunsuppression sind vor der Transplantation je nach Höhe des Isoagglutininintiters mehrere Plasmapherese- bzw. Immunadsorptionsbehandlungen notwendig. Die Plasmapherese (Plasmaaustausch, TPE) ist ein vergleichsweise günstiges Verfahren, entfernt aber auch andere Antikörper als die Isoagglutinine, da das gesamte Plasma durch Plasmaersatz ausgetauscht wird. Bei der Immunadsorption werden hauptsächlich Isoagglutinine entfernt, da das Plasma durch einen speziellen Adsorber geleitet wird, der hochaffin für Isoagglutinine ist. Die anderen Antikörper der Immunabwehr sowie das körpereigene Plasma werden dem Patienten wieder zugeführt. Bei der Immunadsorption handelt es sich aber wegen der Adsorbentmoleküle um ein sehr teures Verfahren.⁵⁴

Wilpert et al. setzen als Grenze für eine erfolgversprechende Transplantation einen Isoagglutininintiter für Anti-A- / Anti-B-IgG von 1/4 am Tag der Transplantation an, sowie in der ersten Woche post-OP erneute Immunadsorptionen bei einem Titer über 1/8, in der zweiten Wochen über 1/16.⁵⁵ Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Lawrence et al. gibt als Richtwert für einen sinnvollen Einschluss in ein Transplantationsprotokoll einen Start-Isoagglutininintiter kleiner oder gleich 1/256 an.⁵⁶ Bei einem Titer höher als 1/256 seien zu viele kostenintensive und für den Patienten kaum mehr zumutbare Plasmapheresebehandlungen notwendig, ohne dass die Wahrscheinlichkeit groß ist, den für die Transplantation notwendigen Titer von 1/4 zu erreichen. Diesen Patienten sollten Alternativen zur Transplantation vorgeschlagen werden.⁵⁶ Langzeitstudien über nach modernen Protokollen durchgeführte AB0-inkompatible Nierentransplantationen zeigten ein ebenso gutes Outcome wie vergleichbare AB0-kompatible Transplantationen.⁴⁹

Fast 25% aller Stammzelltransplantationen werden heute AB0-inkompatibel durchgeführt. Zur Vorbereitung genügen in der Regel mehrere Plasmapheresen des Empfängerblutes zur Reduktion der Isoagglutinine, um eine klinisch relevante lebensgefährliche Hämolyse zu verhindern.^{57,58}

1.7 NACHWEISMETHODEN FÜR ISOAGGLUTININE

1.7.1 HÄMAGGLUTINATION

Goldstandard zum Nachweis von Isoagglutininen in Blutproben ist die Röhrchenmethode (engl. tube test, TT, Röhrchentest).⁵⁹ Dieses einfache und sichere Verfahren nutzt die Tatsache, dass vorhandene Isoagglutinine im Blutplasma sichtbare Agglutinate mit hinzugegebenen Testerythrozyten bilden. Es stehen hierfür die herkömmliche Methode mit Glasröhrchen und flüssigen Reagenzien sowie die modernere Version mit Gelkarten nach Yves Lapierre zur Verfügung.^{11,60} Für die Kartentests werden Kunststoffkarten mit Mikrotitersäulen verwendet.^{11,61} Die Agglutination findet in einem Gel statt, das sich in den Mikroröhrchen befindet und Poren aufweist, die nur nicht-agglutinierte Erythrozyten passieren können.⁶¹ Die Agglutinate einer NaCl-Gelkarte weisen, wie der NaCl-Röhrchentest, vorhandene IgM-Antikörper nach.¹¹

Sollen mithilfe der Hämagglutination auch inkomplette Antikörper in vitro zu einer sichtbaren Agglutination gebracht werden, müssen spezielle Reagenzien zugegeben werden, die das Zetapotentia herabsetzen (sog. LISS), sowie ein Coombstest durchgeführt werden. Für den klassischen Röhrchentest gibt es hierfür ein Reagens, das der Aufdeckung von nicht-neutralisierbaren inkompletten IgG-Antikörpern dient, das Neutr-AB® II (Medion Diagnostics AG, Düringen, Schweiz). Neutr-AB® II enthält wasserlösliche A- und B-Antigene, extrahiert aus Schweine- und Pferdemaenschleimhäuten.⁶² Da die A- und B-Antigene des Neutr-AB® II die im Serum vorhandenen IgM-Antikörper abfangen, handelt es sich bei den Agglutinaten um die inkompletten IgG-Antikörper, denen durch LISS und das Coombsserum die Reaktion mit den Testerythrozyten ermöglicht wird.⁶² Ein entsprechendes Verfahren gibt es für die Gelkarten, wobei diese das Coombsserum bereits enthalten, so dass es nicht extra zugegeben werden muss. Da die Coombskarten kein Neutr-AB® II enthalten, weisen sie additiv komplette IgM-Antikörper und inkomplette IgG-Antikörper nach.¹¹ Eine weitere Möglichkeit, im Röhrchentest IgM von IgG zu unterscheiden, stellt die Zugabe von 2-Mercaptoethanol dar, das selektiv IgM-Antikörper zerstört.⁶³

1.7.2 ELISA

Seit 1989 steht für den Isoagglutininnachweis auch ein ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) zur Verfügung. Diese Technik basiert auf einem enzymatischen Nachweis einer Antigen- / Antikörper-(Ag / Ak)-Reaktion auf einer Mikrotiterplatte. Diese Platte wird zunächst mit einem Antigen beschichtet, z. B. Antigen A. Anschließend wird Plasma der Blutgruppe B dazugegeben und die Antigen-Antikörper-Reaktion abgewartet. Um diese Reaktion sichtbar zu machen, werden nun z. B. monoklonale anti-human-IgG-Ak hinzugefügt, sowie ein Enzym, das zu einer Farbreaktion führt, die umso stärker ist, je mehr Ak binden. Dieser Test hängt vom Bindungs-

verhalten der Antikörper zu synthetischen oder tierischen Antigenen ab. Studien, die den ELISA mit anderen Methoden vergleichen, zeigen, dass das Ergebnis dieses Tests dadurch von den Ergebnissen anderer Verfahren, die menschliche Antigene verwenden, abweicht.^{59,64,65}

1.7.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Während sich die Hämagglutination eignet, IgM und IgG selektiv im Plasma nachzuweisen, stellt die Unterscheidung zwischen den IgG-Untergruppen mittels ELISA auch heute noch ein Problem dar. Mit der 1991 erstmals von Sharon et al. für AB0-Antikörper beschriebenen Technik des FACS (fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie) aber ist es möglich, Anti-A/B-IgM, -IgG, und -IgG-Untergruppen zu differenzieren und zu quantifizieren.⁶⁶ Dafür werden die Ag/Ak-Komplexe mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und durch einen Laserstrahl geführt. Das entstandene Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor ausgewertet und die Komplexe können nach ihren optischen Eigenschaften gezählt und sortiert werden. Diese Methode ermöglicht es, dass nicht nur Antikörper gemessen werden, die gemeinsam mit den entsprechenden Antigenen zu einer Hämagglutination oder Hämolyse führen, sondern erlaubt eine direkte Analyse der Ag/Ak-Komplexe nach ihrer Molekülstruktur.^{59,66}

1.7.4 OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZ

Eine weitere elegante Methode, Anti-A/B-IgM und -IgG nachzuweisen, ist die Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR), die in diesem Zusammenhang erstmals 2005 von Kimura et al. vorgestellt wurden.⁶³ Die AB0-Antigene befinden sich bei dieser Technik auf einem Sensorchip, der bei Zugabe von Antikörpern die Bildung von Ag/Ak-Komplexen durch die Änderung physikalischer Eigenschaften wahrnimmt. Im Grunde handelt es sich um die Wahrnehmung von Massenveränderungen, die durch die Assoziation von Antikörpern und Antigenen auf dem Chip hervorgerufen werden. Dieses Prinzip ermöglicht ein kontinuierliches Echtzeitmonitoring der Assoziation und Dissoziation von Molekülen, ohne dass eine fluoreszierende oder radioaktive Markierung der Moleküle notwendig ist.^{59,63}

1.8 NORMWERTE FÜR ISOAGGLUTININE

Es gibt also heutzutage zahlreiche Möglichkeiten, mit guter Validität den Isoagglutinititer eines Menschen zu bestimmen. Doch wie sieht die Verteilung hoher und niedriger Antikörpertiter in unserer Normalbevölkerung aus? Dass Unterschiede zwischen einzelnen Kollektiven bestehen, ist seit Längerem bekannt (siehe 1.5), doch fehlen in der Literatur bislang Angaben zu Normwerten für Isoagglutinine sowie für verschiedenen Nachweismethoden und Protokolle. Eine Studie, die Normwerte für Isoagglutinine für verschiedene Kollektive anhand höherer Fallzahlen an Er-

wachsenen beschreibt, war bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht veröffentlicht und stellt den Hauptteil dieser Arbeit dar.

1.9 HYPOTHESEN UND PARALLELUNTERSUCHUNGEN

Auf dem Boden der aktuellen Datenlage über Isoagglutinine (siehe oben) im Hinblick auf derzeit verfügbare Quantifizierungsmethoden, einer immunologischen Einordnung und der beabsichtigten Normwertbestimmung für ausgewählte Kollektive stellen sich folgende Fragen bzw. zu überprüfende Hypothesen. Die Grundlage dieser Arbeit bildet das unten beschriebene Kollektiv von 449 Blutproben, das gemeinsam und zu gleichen Teilen von der Autorin dieser Dissertation und der Autorin der korrespondierenden Arbeit mit dem Titel „Unterschiede in den Isoagglutinitern in Abhängigkeit von Blutgruppe, Alter, Geschlecht und Immunstatus“ hinsichtlich der folgenden Hypothesen untersucht wurde.

Methodenvergleich

Hypothese 1:

Die Gelkarte weist Isoagglutinine sensitiver nach als der Röhrchentest (TT). Die Gelkartentiter sind höher als die Röhrchentiter.

Vergleich Anti-B-Titer:

Hypothese 2:

Die Blutgruppe A2 weist höhere Anti-B-Titer auf als die Blutgruppe A1.

Hypothese 3: Die Blutgruppe 0 weist höhere Anti-B-Titer auf als die Blutgruppe A1 sowie höhere Anti-B-Titer als die Blutgruppe A2.

Vergleich Anti-A1- und Anti-A2-Titer:

Hypothese 4:

Blutgruppe 0 weist höhere Anti-A1- und Anti-A2-Titer auf als Blutgruppe B.

Hypothese 5:

Innerhalb der Blutgruppe 0 sind die Anti-A1-Titer höher als die Anti-B-Titer.

Hypothese 6:

Der Anti-B-Titer der Blutgruppe A1 ist höher als der Anti-A1-Titer der Blutgruppe B.

Vergleich allgemein:

Hypothese 7:

Frauen haben höhere Isoagglutinintiter als Männer.

Hypothese 8:

Gesunde haben höhere Isoagglutinintiter als Kranke.

Hypothese 9:

Junge haben höhere Isoagglutinintiter als Alte.

1.10 FRAGESTELLUNG

Es stellen sich zwei Hauptfragen:

- (1) Sind die beiden heutzutage am häufigsten durchgeführten Methoden zur Isoagglutininbestimmung bezüglich ihrer Sensitivität und Titerhöhe vergleichbar oder signifikant unterschiedlich?
- (2) Ist eine Normwerterstellung für Isoagglutinititer an größeren Kollektiven (Blutgruppe A1, A2, B, 0) und hieraus für kleinere Untergruppen (alt/jung, krank/gesund, weiblich/männlich) für jeweils verschiedene im klinischen Alltag übliche Nachweismethoden möglich?

1.10.1 METHODENVERGLEICH

Dazu wird im ersten Teil der vorliegenden Arbeit folgende Hypothese überprüft:

Weist die Gelkarte Isoagglutinine sensitiver nach als der Röhrchentest (T^I)?

Es werden 449 Blutproben der Blutgruppen A1, A2, B und 0 auf die Höhe ihrer Isoagglutinititer getestet. Dabei wird die Titerbestimmung parallel mittels der Röhrchenmethode und der Kartenmethode durchgeführt. Unter der Annahme, dass die Sensitivität für Isoagglutinine eines Tests mit der Höhe der gemessenen Titer korreliert, werden beide zu vergleichende Methoden einander anhand eines Gesamtkollektivs und dessen Untergruppen statistisch gegenübergestellt. Es wird erwartet, dass die Gelkartentiter höher ausfallen als die Röhrchentiter.

1.10.2 NORMWERTBESTIMMUNG AN GRÖßEREN KOLLEKTIVEN

Normwerte für Isoagglutinine sind besonders im Rahmen von Transplantationen und Immunsuppressionen wieder in den Fokus der Interessen getreten. Da in der Literatur keine Normwerte beschrieben werden, die anhand größerer Kollektive gewonnen wurden, ist es das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit, Normwerte für Isoagglutinine für den klinischen Alltag festzulegen. Hierfür werden die Isoagglutinititer für das Gesamtkollektiv, die Untergruppen und die jeweils verwendeten klinisch üblichen Nachweismethoden (Gelkarte, Röhrchen, IgG-Coombskarte) einer Normwertbildung unterworfen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen der Isoagglutinititer bilden die Grundlage für zwei Dissertationen. Andrea Hennig geb. Weingandt und Anna Oßwald führten gemeinsam die praktischen Untersuchungen und Auswertungen der Ergebnisse durch und arbeiteten verschiedene Fragestellungen heraus, die als eigenständige Dissertationen unter den Titeln „Nachweismethoden und Normwerte für Isoagglutinine beim Menschen“ (diese Arbeit) und „Unterschiede in den Isoagglutinititern in Abhängigkeit von Blutgruppe, Alter, Geschlecht und Immunstatus“ veröffentlicht werden.

Von April bis August 2011 wurden insgesamt 449 Blutproben von Blutspendern und Patienten des Klinikums Großhadern untersucht. Dabei standen die Räumlichkeiten und Geräte des Labors der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Haemostaseologie im Klinikum Großhadern zur Verfügung.

2.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Die für die Untersuchungen verwendeten Materialien waren labortypische Geräte, Substanzen und Untersuchungsmaterialien, die im Folgenden detailliert beschrieben werden.

2.1.1 BLUTPROBEN

Für den Nachweis der Isoagglutinine im Blut wurden Proben von Blutspendern untersucht, die in der Klinik für Transfusionsmedizin regelmäßig Blut spenden, sowie Proben von Patienten, für die Blutprodukte in der Blutbank bestellt wurden.

Die Titerbestimmung wurde an pseudonymisierten Untersuchungsproben ohne Rückschlußmöglichkeit auf die konkrete Person durchgeführt. Das Material hierfür stammte aus den gesetzlichen vorgeschriebenen Rückstellproben für immunhämatologische Untersuchungen. Somit konnte ohne nochmalige Blutentnahme, ohne erhöhtes Probenahmenvolumen und ohne Gefährdung der durch die Rückstellproben verfolgten Zwecke eine retrospektive Untersuchung der Blutproben durchgeführt werden. Bekannt waren den Doktorandinnen eine pseudonymisierte Untersuchungsnummer, Blutgruppe, Geschlecht und Geburtsjahr, sowie die Zugehörigkeit der Probe zur Gruppe der Patienten oder der Spender.

Der Materialbedarf lag bei 1,5 ml Blutplasma. Durch die Untersuchungen wurde die notwendige Routinediagnostik des Kliniklabors nicht behindert oder erschwert. Alle Blutproben wurden als EDTA-Blut abgenommen und bis zur Untersuchung für mindestens 24 Stunden in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert. Das Plasma wurde bei bereits sedimentierten Erythrozyten direkt abpipettiert; war dies nicht der Fall, wurde die Blutprobe 3min bei 3000rpm zentrifugiert.

Für jede Blutprobe wurden pseudonymisiert die Blutgruppe, Geschlecht, Alter und Zuordnung Patient/Spender zur Verfügung gestellt. So konnten die jeweiligen Blutproben eindeutig den unterschiedlichen Kollektiven (die Gruppe der Gesunden versus die Gruppe der Patienten, alt – geboren bis 1936 – versus jung – geboren nach 1936 – und männlich versus weiblich) zugeordnet werden.

Nicht in die pseudonymisierte Datenübermittlung aufgenommen wurden Blutproben mit irregulären erythrozytären Antikörpern wie Kälteantikörper, sowie Blutproben von Patienten aus der Hämatologie und Onkologie.

2.1.1.1 SPENDERBLUT

Das Klinikum Großhadern hat ein Kollektiv von ca. 300 frequenten Blutspendern, die regelmäßig alle 4 Wochen zum Blutspenden für Thrombozytapheresekonzentrate in die Abteilung für Transfusionsmedizin kommen. Als Grundvoraussetzung müssen die Spender zwischen 18 und 68 Jahre alt sein und sich in guter gesundheitlicher Verfassung befinden. Um ein hohes Maß an Sicherheit gewährleisten zu können, müssen die Blutspender darüber hinaus weitere Kriterien erfüllen. So werden sie nach einem Auslandsaufenthalt in einem Malariagebiet zeitweise vom Spenden ausgeschlossen, sowie nach kürzlich durchgeführten Operationen. Dauerhafter Ausschluss erfolgt bei Infektionserkrankungen wie Hepatitis oder HIV, sowie Krebserkrankungen.⁶⁷ Daher wird angenommen, dass Blutspender eine repräsentative Gruppe an gesunden Menschen unserer Population darstellen. Dieses Kollektiv wird daher als „Gesunde“ bezeichnet.

2.1.1.2 PATIENTENBLUT

Das zweite Kollektiv der Plasmaproben stammt von Blutproben, welche zur Routinebestimmung bei der Bestellung von Blutprodukten für Patienten in der Transfusionsmedizin eingingen. Es wurden primär chirurgische Patienten ausgewählt, um iatrogene Verfälschungen der Ergebnisse durch Chemotherapie oder Immunsuppression zu vermeiden. In dieser Gruppe finden sich demzufolge kranke Menschen, die sich zur Behandlung im Klinikum Großhadern befinden. Dieses Kollektiv wird daher als „Kranke“ bezeichnet.

2.1.2 LABORMATERIALIEN

Für die Versuche wurden diverse labortypische Testsubstanzen verwendet.

2.1.2.1 TESTERYTHROZYTEN

Um eine Agglutination der verschiedenen Antikörper zu provozieren, müssen den Plasmaproben Erythrozyten zugefügt werden, deren Antigenmuster bezüglich der Blutgruppen bekannt ist.

Hierbei handelt es sich um DiaMed-ID Testerythrozyten (Bio-Rad Laboratories, DiaMed GmbH, Cressier, Schweiz) für das ID-Micro Typing System (Bio-Rad Laboratories, DiaMed GmbH, Cressier, Schweiz) der Blutgruppen A1, A2, B und 0. Diese Testerythrozyten sind menschlichen Ursprungs, in einer Suspension von 0,8% gepuffert und sind immer eine Mischung aus verschiedenen Spendern, um eine standardisierte AB0-Antigendichte zu erzeugen. Als Konservierungsmittel enthalten sie Trimethoprim und Sulfamethoxazol.⁶⁸ Sie wurden unter standardisierten Bedingungen vorbereitet. Dafür wurden sie vorsichtig aufgeschwemmt, auf Raumtemperatur gebracht und dreimalig mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und jeweils anschließend 3 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Erythrozytensediment mit ID CellStab (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Schweiz), einem Glycin-Kochsalzpuffer, der mit Trimethoprim und Sulfamethoxazol versetzt ist, verdünnt. Die entstandene 3-5% Erythrozytensuspension wurde in gekennzeichnete Fläschchen gefüllt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.1.2.2 DILUENT

Beim verwendeten ID-Diluent 2 Testerythrozyten (Bio-Rad Laboratories, DiaMed GmbH, Cressier, Schweiz) handelt es sich um eine modifizierte LISS (Low ionic Strength Solution), die die Assoziationsrate von Antikörpern erhöht, so dass eine stärkere Antigen-Antikörperreaktion ermöglicht wird. Als Konservierungsmittel enthält ID-Diluent 2 die Antibiotika Trimethoprim und Sulfamethoxazol.

2.1.2.3 LISS

Zur Verminderung der Ionenstärke und Verstärkung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde eine Low-ionic-strength-Solution als Additiv zum Inkubationsmedium zugegeben. Es handelt sich um das Produkt MLB 2 der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Dies ermöglicht den Nachweis der inkompletten Antikörper im Reagenzglas.

2.1.2.4 COOMBSSERUM

Anti-Human Globulin Mono-Type® Grün (Coombsserum, Medion Diagnostics AG, Düringen, Schweiz) wird aus dem Serum immunisierter Kaninchen gewonnen bzw. stammt von einer Maushybridoma-Zell-Linie und dient dazu, In-vivo- oder In-vitro-Beladungen mit Immunglobulinen und / oder Komplementanteilen sichtbar zu machen. Dieses polyspezifische Coombsserum wird aus Anti-IgG vom Kaninchen sowie aus monoklonalem Anti-C3b und monoklonalem Anti-C3d von der Maus hergestellt. Es wird für direkte und indirekte Coombstests eingesetzt. Die grün eingefärbte Version eignet sich besonders gut, weil dadurch eine visuelle Kontrolle der Reagenzzugabe gewährleistet ist.

2.1.2.5 NEUTR-AB® II

Bei Neutr-AB® II (Medion Diagnostics AG, Düringen, Schweiz) handelt es sich um wasserlösliche A- und B-Antigene, extrahiert aus Schweine- und Pferdemaßgeschleimhäuten mit zugesetzten Konservierungsmitteln. Diese tierischen A- und B-Antigene des Neutr-AB® II fangen die im Serum vorhandenen IgM-Antikörper ab. Wenn dennoch eine Agglutination stattfindet, handelt es sich um eine Reaktion der inkompletten IgG-Antikörper, denen durch LISS und das Coombsserum die Reaktion mit den Testerythrozyten ermöglicht wird.⁶²

2.1.3 GELKARTEN

Als neue Festphasenassays standen die ID-Gelkarten der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) zur Verfügung.

2.1.3.1 NaCl-GELKARTEN

Es wurden NaCl-Gelkarten vom Typ ID-Card „NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins“ der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit 6 Mikroröhrchen und neutraler Gelsuspension verwendet. Als Konservierungsmittel wird <0,1% NaN₃ verwendet.

2.1.3.2 IGG-COOMBS-GELKARTEN

Es wurden Gelkarten vom Typ „Anti IgG rabbit“ der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Diese bestehen aus 6 Mikrotrichtern mit Anti-Humanglobulin Anti-IgG, das aus dem Serum immunisierter Kaninchen gewonnen wird.

2.1.4 LABORGERÄTE

Für die Untersuchungen wurden labortypische Geräte verwendet, die im Folgenden aufgeführt werden. Es handelt sich um Geräte des klinikeigenen Labors der Blutbank Großhadern.

Die verwendeten Pipetten sind:

- Eppendorf Reference Pipette 100µl und 1000µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- ID Pipetor MP1 für 10µl / 25µl / 50µl (Diamed Israel Ltd., Yokneam, Israel)
- Thermo Scientific (Diamed Israel Ltd., Yokneam, Israel)

Für die Durchführung der Versuche wurden verschiedene Zentrifugen eingesetzt. Es handelt sich im Einzelnen um:

- Tischzentrifuge Sigma 2-5 (DJB Labcare Ltd., Buckinghamshire, UK)

- Waschzentrifuge DiaCent-CW (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Kartenzentrifuge ID Zentrifuge 24S (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

Als Inkubator wurde ein ID Incubator 37 S1 (Diamed Israel Ltd., Yokneam, Israel) verwendet.

2.2 METHODIK

Der Nachweis der Isoagglutinine erfolgte mittels vier verschiedener Methoden, nämlich dem (1) NaCl-Röhrchen-Nachweis, dem Nachweis in (2) NaCl- und (3) IgG-Coombs-Gelkarten und in (4) Neutr-AB® II-Röhrchen. Diese Methoden werden im Folgenden im Detail beschrieben. Die Methoden wurden direkt nacheinander durchgeführt und anschließend ausgewertet. Die Grundlage jeder Methode war eine Titerreihe, bei der das Blutplasma in einer zehnstufigen geometrischen Titerreihe (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) verdünnt wurde, mit dem Ziel einer semi-quantitativen Unterscheidung der Blutproben hinsichtlich ihres Antikörpergehalts. Dies bedeutet, in welcher Verdünnung und damit bei welcher Titerstufe noch eine Antigen-Antikörper-Reaktion abzulesen war. Zu beachten ist, dass kein linearer Abstand zwischen den einzelnen Titerstufen vorliegt, sondern es sich um eine logarithmische Reihe 2^n handelt.

2.2.1 NaCl-RÖHRCHEN-NACHWEIS

Zum Erstellen der Titerreihe wurden zuerst die benötigten 10 Röhrchen bereitgestellt und beschriftet. Zusätzlich wurden als Negativkontrollen zu Beginn jeder Titerreihe ein Röhrchen mit NaCl und Plasma der Blutgruppe AB, sowie ein Röhrchen mit NaCl und den Testerythrozyten angelegt, um eine eventuelle Autoagglutination auszuschließen. In jedes Röhrchen, mit Ausnahme des ersten, wurden 300µl PBS vorgelegt. In das erste Röhrchen wurden 600µl Plasma aus der Blutprobe pipettiert.

Anschließend wurden aus Röhrchen 1 300µl entnommen und in Röhrchen 2 pipettiert. Durch 3-maliges Ansaugen und Abgeben mit der Pipette wurde jeweils gemischt, bevor wieder 300µl entnommen und in das folgende Röhrchen abgegeben wurden. Die Verdünnung wurde also fortlaufend jeweils um die Hälfte verstärkt und das Resultat war eine Titerreihe 1:1 bis 1:512. In einem zusätzlichen Röhrchen wurden die 300µl aus Röhrchen 10 aufgehoben, um bei extrem hoch ausfallenden Reaktionen die Titerreihe zu erweitern. Die schematische Darstellung dieses Ablaufes findet sich in **Tabelle 1**.

Tabelle 1. Schema zur Herstellung der Titerreihe.

Röhrchen	Neg. Ko 1	Neg. Ko 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Titer			1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
PBS	300µl	300µl	0	300µl	300µl	300µl	300µl	300µl	300µl	300µl	300µl	300µl
Plasma	300µl AB- Plasma	50µl Test- Erys	600µl	→ 300µl	→ 300µl	→ 300µl	→ 300µl	→ 300µl	→ 300µl	→ 300µl	→ 300µl	→ 300µl

Je nach Blutgruppe wurden nun 10 Röhrchen pro zu untersuchendem Antikörper beschriftet: für die Blutgruppen A₁ und A₂ jeweils eine Reihe mit der Aufschrift „Testerythrozyt B“ und für die Blutgruppe B zwei Reihen, eine Reihe mit „Testerythrozyt A₁“ und eine Reihe mit „Testerythrozyt A₂“. Für Blutgruppe 0 wurden 3 Reihen vorbereitet, nämlich für Testerythrozyt A₁, A₂ und B. Jede Reihe wurde mit 50µl der jeweiligen Testerythrozytensuspension befüllt. Anschließend wurden 100µl der Titerreihe (Röhrchen 1-10) entnommen und zu der Erythrozytensuspension, entsprechend der Titerstufe, zugefügt.

Die Verdünnungen wurden anschließend bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubiert und nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge Sigma bei 1500 rpm für 30 Sekunden über dem Lichtkasten ausgewertet. Die Auswertung ist unter 2.2.4 detailliert beschrieben.

2.2.2 GELKARTEN-NACHWEIS

Im Unterschied zum Röhrchentest wird in den NaCl-Karten und IgG-Coombs-Kartentests die Reaktion nicht in Röhrchen, sondern in speziellen Gelkarten bestehend aus 6 Mikrosäulen durchgeführt. Erythrozyten, die nicht agglutinieren, sedimentieren auf den Boden der Karte. Agglutinierte Erythrozyten hingegen werden von dem Gel aufgehalten und zeigen sich als roter Streifen, wie in Abbildung 4 exemplarisch gezeigt ist. Die beiden Tests unterscheiden sich in unterschiedlichen Verstärkermidien, welche sich in dem Gel befinden.^{61,69}

Zu Beginn der Untersuchung wurde auch bei diesen Tests eine Stammtiterreihe in beschrifteten Röhrchen (1-10) angesetzt. Anstelle der Kochsalzlösung wurde für diese Methoden ID-Diluent² verwendet. Für die Verdünnungsreihe der beiden Kartentiter wurde in 9 von 10 Röhrchen 300µl ID-Diluent² vorgelegt, im ersten Röhrchen befanden sich 600µl reines Plasma. Nun wurden jeweils 300µl aus dem ersten Röhrchen in das zweite Röhrchen pipettiert und eine zehnstufige Verdünnungsreihe hergestellt.

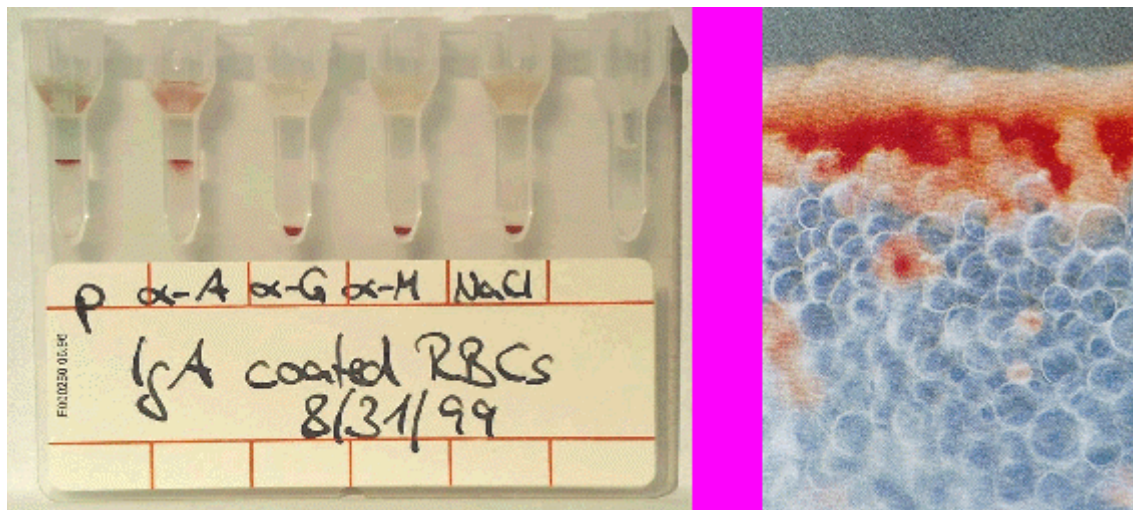


Abbildung 4. Gelkarte zum Nachweis von IgA auf Erythrozyten (links), Gelmatrix mit Agglutinat (rechts) nach Schoenhage ⁶⁹

2.2.2.1 NaCl-GELKARTEN

Die Mikrosäulen der NaCl-Gelkarte sind mit Dextrangel gefüllt. Jede Karte hat 6 Säulen mit einer trichterförmigen Öffnung. Pro nachzuweisendem Antikörper wurden 2 Karten beschriftet und die Titer aus den Röhrchen entsprechend pipettiert. Dabei wurden je 25µl 3-5% Testerythrozytensuspension und 25µl des vorbereiteten Diluent2-Serum-Gemisches der jeweiligen Titerstufe (1-10) in den nach oben erweiterten Bereich des Mikroröhrchens pipettiert. Nach Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation in der Kartenzentrifuge (ID-Zentrifuge 24S) für 10 Minuten wurden die Karten über dem Lichtkasten ausgewertet und die Ergebnisse dokumentiert.

2.2.2.2 IGG-COOMBS-KARTE

Zum Nachweis inkompletter Antikörper befindet sich in den Säulen der IgG-Coombs-Karte neben dem Verstärker LISS auch ein Antihumanglobulinserum. Ausgangsmaterial dieses Tests ist die gleiche Titerreihe, die bereits für die NaCl-Gelkarten benutzt wurde. Auch hier sind pro nachzuweisendem Antikörper zwei Karten notwendig. In die beschrifteten Karten wurden entsprechend den Titerstufen je 25µl 3-5% Testerythrozytensuspension und 25µl des vorbereiteten Diluent2-Serum-Gemisches gegeben. Anschließend wurden die Karten 15 Minuten bei 37°C inkubiert (ID-Incubator 37 S I) und danach 10 Minuten in der Kartenzentrifuge (ID-Zentrifuge 24S) zentrifugiert. Die Ergebnisse wurden sofort über dem Lichtkasten ausgewertet und dokumentiert.

2.2.3 NACHWEIS IM NEUTR-AB® II-RÖHRCHEN

Der Neutr-AB® II-Röhrchentiter dient der Aufdeckung von nicht neutralisierbaren inkompletten IgG-Antikörpern. Bei diesem Röhrchentest werden die Supplementphase und die Coombsphase miteinander verbunden und Agglutinationen inkompletter Antikörper sichtbar gemacht. Neutr-AB® II enthält wasserlösliche A- und B-Antigene, extrahiert aus Schweine- und Pferdema-genschleimhäuten.

Für den Neutr-AB® II-Titer wurden 300µl Plasma benötigt. Diese wurden mit 300µl Neutr-AB® II gemischt und für 60min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde eine Titerreihe in 9 Röhrchen angesetzt, wobei das NaCl durch Liss (low ionic strenght solution) ersetzt wurde. Zu beachten war, dass bereits das erste Röhrchen eine Verdünnung 1:2 enthielt, da es sich um die Neutr-AB® II-Plasma-Mischung handelte. 100µl des vorbereiteten Neutr-AB® II-Serum-Gemisches der jeweiligen Titerstufe (2-10) wurden mit 50µl 3-5% Testerythrozytensuspension in beschrifteten Glasröhrchen gemischt und 15 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Röhrchen wurden anschließend in der Waschzentrifuge (DiaCent-CW) gewaschen, mit Anti-Human Globulin Mono-Type® Grün (Coombsserum) gemischt, nochmals zentrifugiert und danach über dem Lichtkasten ausgewertet.

2.2.4 AUSWERTUNGSBOGEN

Die Ergebnisse wurden im Anschluss an die Testreihen in einem Auswertungsbogen erfasst. Die unterschiedlichen Agglutinationen wurden bei positivem Ergebnis als Werte von 1 bis 4 (schwache bis starke Agglutination) festgehalten. In **Abbildung 5** ist dargestellt, nach welchen Kriterien die Gelkarten in vier unterschiedliche Agglutinationsstufen eingeteilt wurden.

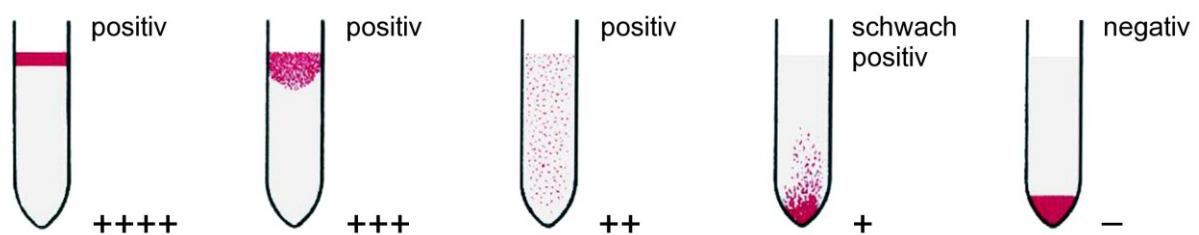


Abbildung 5. Auswertung der Gelkarten nach Yves Lapierre ⁷⁰

Als Endtiter wurde der letzte noch nachweisbare Titer in der höchsten Verdünnungsstufe bezeichnet. Als Titerabfall wurde die Titerstufe, bei der die Agglutination von Stufe 3 auf Stufe 2 abfällt, dokumentiert. Als dritter Wert wurde der Titterscore festgehalten. Er berechnet sich als Summe der Produkte von Titerstufe (1 bis n) und Stärke der Agglutination (0, 1, 2, 3, 4) für alle angesetzten Verdünnungen.

Zu jeder Blutprobe wurden Alter, Geschlecht, Blutgruppe, und Eingruppierung Spender oder Patient erfasst.

2.2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Ergebnisse aus dem Auswertungsbogen wurden anschließend tabellarisch sortiert (Excel, Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Es wurden Alter, Geschlecht, Spender / Patient, Blutgruppe und für die einzelnen Tests und jeweiligen Antikörper Titerende, Titerabfall und Titterscore erfasst. Aus dieser Tabelle wurden anschließend der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung berechnet, sowie Histogramme erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SigmaPlot (Version 10.0, Systat Software, Inc., IL, USA). Zum statistischen Vergleich der unterschiedlichen Probenkollektive wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Der Vergleich der verschiedenen Tests sowie die Überprüfung der Titerhöhen innerhalb der Blutgruppen erfolgten mit dem gepaarten Wilcoxon-Test. Für alle Tests wurde ein statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$ angenommen.

Die Ermittlung der Referenzwerte für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte mittels der nicht-parametrischen, robusten Methode für Kollektive zwischen 20 und 120 Proben, wie vom CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in der Leitlinie C28-A3 vorgegeben.⁷¹ Hierfür wurde das Statistikprogramm MedCalc 2013 (MedCalc Software, Ostend, Belgien) verwendet. Als Test für Ausreißer fungierte der Test nach Tukey, 1977.⁷² Auf Normalverteilung wurde nach D'Agostino-Pearson getestet. Die Referenzwerte basieren nach medizinischem Standard auf einem Referenzintervall von 95% mit einem Konfidenzintervall für die untere und obere Grenze von jeweils 90%. Die Ergebnisse wurden auf ganze Zahlen gerundet und im Ergebnisteil als Titerstufe angegeben. Beim Wert „Score“, der das Produkt aus Titerstärke (1-4) und Titerstufe (1:1 bis 1:512; selten bis 1:8000) darstellt, wurde nur dieser Wert angegeben. Da es sich bei den Scorewerten um logarithmisch verteilte Daten handelt, die zur Auswertung sinnvollerweise logarithmisch transformiert werden (dekadischer Logarithmus), wurden Score-Werte von 0 (Reaktion negativ, aber $\log 0 = -\infty$) durch 0,1 ($\log 0,1 = -1$) ersetzt.

Normwerte wurden in der vorliegenden Arbeit für Abfall, Ende und Score der Proben für drei verschiedene Nachweismethoden (NaCl-Röhrchenmethode, NaCl-Kartenmethode, IgG-Coombs-Kartenmethode) bestimmt. Auf eine Normwertdarstellung der Ergebnisse des Neutr-AB® II-Tests wurde verzichtet, da nur in wenigen Fällen überhaupt ein Titer nachweisbar war. Für die anderen Methoden wurden die untere und obere Grenze des Referenzbereiches in Form des zugehörigen Konfidenzintervalls von 90% angegeben. Konnte aufgrund fehlender Normalverteilung oder zu geringer Homogenität des Kollektivs kein Konfidenzintervall für die Refe-

renzgrenzen berechnet werden, da das Konfidenzintervall ein Fünftel des Referenzintervalls überschritt (nach CLSI)⁷¹, werden die Referenzgrenzen in Klammern angegeben. Für jeden Normwert wird die Anzahl n des zugrundeliegenden Kollektivs angegeben. Ein Mindestanzahl von $n = 40$ wurde für jedes Kollektiv angestrebt. Eine geringere Anzahl wurde ausschließlich bei den Kollektiven der Spender akzeptiert, da die Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie (ATMZH) des Klinikums der Universität München Großhadern nur über eine begrenzte Anzahl an Dauerspendern verfügt, die bei selteneren Blutgruppen (B, A2) eine Anzahl von 40 Dauerspendern nicht oder nur knapp erreicht.

3 ERGEBNISSE

3.1 VERGLEICH DER NACHWEISMETHODEN NaCl-RÖHRCHEN VS. NaCl-GELKARTE

Nachfolgend wird das Ergebnis des Vergleichs zweier verschiedener Nachweismethoden für Isoagglutinine bezüglich ihrer Sensitivität für Isoagglutinine behandelt. Vergleichswert für die Höhe eines Titers waren jeweils die Werte „Score“ und „Ende“ eines Titers. Es werden die signifikanten Ergebnisse beschrieben, für die jeweils ein p-Wert $< 0,05$ angelegt wurde.

3.1.1 DETAILLIERTE ERGEBNISBESCHREIBUNG

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse des Vergleichs der beiden Methoden für alle untersuchten Kollektive gezeigt. „Score“ und „Ende“ zeigten dabei das gleiche Ergebnis, so dass keine separaten Tabellen erstellt werden.

Tabelle 2. Vergleich Röhrenmethode und Gelkarte. KT: Kartentest, RT: Röhrentest, ns: kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden, >: signifikant höher.

Blutgruppe	Antikörper	Alle	Patient	Spender	Männer	Frauen	Alte	Junge
A1	Anti-B	RT > KT	ns	RT > KT	RT > KT	ns	RT > KT	RT > KT
A2	Anti-B	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B	Anti-A1	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT
B	Anti-A2	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT	RT > KT
0	Anti-A1	KT > RT	KT > RT	ns	KT > RT	KT > RT	KT > RT	ns
0	Anti-A2	KT > RT	KT > RT	RT > KT	KT > RT	KT > RT	KT > RT	ns
0	Anti-B	KT > RT	KT > RT	ns	KT > RT	KT > RT	KT > RT	KT > RT

Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen A1, A2, B und 0 der Gruppe „Alle“ zeigte sich, dass die Antikörpertiter der Blutgruppe A1 (Anti-B) und B (Anti-A1 und Anti-A2) signifikant höhere Titer im NaCl-Röhrchentest aufwiesen als im NaCl-Kartentest. Die Titer der Blutgruppe 0 (Anti-A1, Anti-A2 und Anti-B) waren im Kartentest signifikant höher, die Titer der Blutgruppe A2 (Anti-B) unterschieden sich in beiden Tests nicht signifikant.

Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen A1, A2, B und 0 der Gruppe „Männlich“ zeigte sich, dass die Antikörpertiter der Blutgruppe A1 (Anti-B) und B (Anti-A1 und Anti-A2) signifikant höhere Titer im NaCl-Röhrchentest aufwiesen als im NaCl-Kartentest. Die Titer der Blutgruppe 0 (Anti-A1, Anti-A2 und Anti-B) waren im Kartentest signifikant höher, die Titer der Blutgruppe A2 (Anti-B) unterschieden sich in beiden Tests nicht signifikant.

Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen A1, A2, B und 0 der Gruppe „Weiblich“ zeigte sich, dass die Antikörpertiter der Blutgruppe B (Anti-A1 und Anti-A2) signifikant höhere Titer im NaCl-Röhrchentest aufwiesen als im NaCl-Kartentest. Die Titer der Blutgruppe 0 waren im Kartentest signifikant höher, die Titer der Blutgruppe A1 und A2 unterschieden sich in beiden Tests nicht signifikant.

Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen A1, A2, B und 0 der Gruppe „Spender“ zeigte sich, dass die Antikörpertiter der Blutgruppe A1 (Anti-B) und B (Anti-A1 und Anti-A2) signifikant höhere Titer im NaCl-Röhrchentest aufwiesen als im NaCl-Kartentest. Die Titer der Blutgruppe 0 waren ebenfalls im Röhrchentest beim Vergleich des Unterpunktes „Anti-A2 Ende“ signifikant höher. Die Titer der Blutgruppe A2 unterschieden sich in beiden Tests nicht signifikant, ebenso wenig die restlichen Unterpunkte der Blutgruppe 0 (Anti-A1 Ende / Score, Anti-A2 Score, Anti-B Ende / Score).

Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen A1, A2, B und 0 der Gruppe „Patient“ zeigte sich, dass die Antikörpertiter der Blutgruppe B (Anti-A1 und Anti-A2) signifikant höhere Titer im NaCl-Röhrchentest aufwiesen, als im NaCl-Kartentest. Die Titer der Blutgruppe 0 waren im Kartentest signifikant höher, die Titer der Blutgruppe A1 und A2 unterschieden sich in beiden Tests nicht signifikant.

Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen A1, A2, B und 0 der Gruppe „Alt“ zeigte sich, dass die Antikörpertiter der Blutgruppe A1 (Anti-B) und B (nur Anti-A2) signifikant höhere Titer im NaCl-Röhrchentest aufwiesen, als im NaCl-Kartentest. Die Titer der Blutgruppe 0 waren im Kartentest signifikant höher, die Titer der Blutgruppe A2 unterschieden sich in beiden Tests nicht signifikant.

Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen A1, A2, B und 0 der Gruppe „Jung“ zeigte sich, dass die Antikörpertiter der Blutgruppe A1 (Anti-B) und B (Anti-A1 und Anti-A2) signifikant höhere Titer im NaCl-Röhrchentest aufwiesen, als im NaCl-Kartentest. Die Titer der Blutgruppe

0 (Anti-B) waren im Kartentest signifikant höher, die Titer der Blutgruppe A2 und 0 (Anti-A1) unterschieden sich in beiden Tests nicht signifikant.

3.1.2 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES METHODENVERGLEICHS

In der Röhrenmethode zeigten sich höhere Titer bei allen Blutgruppen mit Ausnahme der Blutgruppe 0. Bei Blutgruppe 0 ergab fast immer die Kartenmethode höhere Titer. Dies konnte in allen Untergruppen (Spender, Patient, männlich, weiblich, alt, jung) bestätigt werden. Es ergibt sich also keine eindeutige Tendenz bezüglich der Sensitivität der Röhren- und Kartenmethode, signifikant höhere Röhrentiter halten sich mit signifikant höheren Kartentitern die Waage.

3.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE ERMITTELTEN NORMWERTE FÜR ISOAGGLUTININTITER

Nachfolgend werden die Normwerte des klinisch relevanten Titerendes für drei verschiedene Nachweismethoden (NaCl-Röhrchenmethode, NaCl-Kartenmethode, IgG-Coombs-Kartenmethode) zusammengefasst und beschrieben. Die Normwerte für Abfall, Ende und Score der Proben sind im Anhang vollständig aufgelistet. Angegeben sind im Folgenden die untere und obere Grenze des Referenzbereiches in Form des zugehörigen Konfidenzintervalls von 90%. Konnte aufgrund fehlender Normalverteilung oder zu geringer Homogenität des Kollektivs kein Konfidenzintervall für die Referenzgrenzen berechnet werden, da das Konfidenzintervall ein Fünftel des Referenzintervalls überschreiten würde ⁷¹, sind die Referenzgrenzen in Klammern angegeben. Für jeden Normwert ist die Anzahl n des zugrundeliegenden Kollektivs angegeben. Ein Mindestanzahl von $n = 40$ wurde für jedes Kollektiv angestrebt. Eine geringere Anzahl wurde ausschließlich bei den Kollektiven der Spender akzeptiert, da die Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie (ATMZH) des Klinikums der Universität München Großhadern nur über eine begrenzte Anzahl an Dauerspendern verfügt, die bei selteneren Blutgruppen (B, A2) eine Anzahl von 40 Dauerspendern nicht oder nur knapp erreicht. Es wurden Normwerte für die Kollektive AB0, Alt, Jung, Spender und Patient erstellt. Da sich in der statistischen Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen den Kollektiven Männlich/Weiblich zeigte, war eine separate Normwertbestimmung für diese Kollektive nicht sinnvoll.

3.2.1 NORMWERTE DES KOLLEKTIVS AB0

Nebenstehende Tabelle 3 zeigt die ermittelten Normwerte für das Titerende der Gruppe AB0. Hierfür wurde das Gesamtkollektiv (n = 449) nach der Blutgruppenzugehörigkeit in die Gruppen A1, A2, B und 0 aufgeteilt und Normwerte für die jeweiligen Antikörper berechnet.

Abkürzungen:

„AB0 A1 Anti B“ = Kollektiv AB0, Blutgruppe A1, Antikörpertiter Anti B

„AB0 A2 Anti B“ = Kollektiv AB0, Blutgruppe A2, Antikörpertiter Anti B

„AB0 B Anti A1“ = Kollektiv AB0, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A1

„AB0 B Anti A2“ = Kollektiv AB0, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A2

„AB0 0 Anti A1“ = Kollektiv AB0, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A1

„AB0 0 Anti A2“ = Kollektiv AB0, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A2

„AB0 0 Anti B“ = Kollektiv AB0, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti B

Tabelle 3. Normwerte des Kollektivs AB0

Kollektiv	n	Titerstufe	
		Untere Grenze 1/	Obere Grenze 1/
AB0 Gruppe A1			
NaCl-Röhrchen AB0 A1 Anti B	108	1 bis 2	128 bis 256
NaCl-Karte AB0 A1 Anti B	108	0 bis 1	128 bis 256
IgG Coombs-Karte AB0 A1 Anti B	108	0 bis 1	128 bis 256
AB0 Gruppe A2			
NaCl-Röhrchen AB0 A2 Anti B	111	2 bis 4	256 bis 512
NaCl-Karte AB0 A2 Anti B	111	2 bis 4	256 bis 512
IgG Coombs-Karte AB0 A2 Anti B	111	2 bis 4	256 bis 512
AB0 Gruppe B Anti A1			
NaCl-Röhrchen AB0 B Anti A1	119	4 bis 8	256 bis 512
NaCl-Karte AB0 B Anti A1	119	2 bis 4	128 bis 256
IgG Coombs-Karte AB0 B Anti A1	119	(4)	(256)
AB0 Gruppe B Anti A2			
NaCl-Röhrchen AB0 B Anti A2	119	1	64 bis 128
NaCl-Karte AB0 B Anti A2	119	0	64 bis 128
IgG-Coombs-Karte AB0 B Anti A2	119	0	32 bis 64
AB0 Gruppe 0 Anti A1			
NaCl-Röhrchen AB0 0 Anti A1	111	4 bis 8	256 bis 512
NaCl-Karte AB0 0 Anti A1	111	2 bis 8	512 bis 1024
IgG-Coombs-Karte AB0 0 Anti A1	111	(32)	(2048)
AB0 Gruppe 0 Anti A2			
NaCl-Röhrchen AB0 0 Anti A2	111	1 bis 2	128 bis 256
NaCl-Karte AB0 0 Anti A2	111	0 bis 2	256 bis 512
IgG-Coombs-Karte AB0 0 Anti A2	111	1 bis 4	2048 bis 8192
AB0 Gruppe 0 Anti B			
NaCl-Röhrchen AB0 0 Anti B	111	(2)	(128)
NaCl-Karte AB0 0 Anti B	111	2 bis 4	256 bis 512
IgG-Coombs-Karte AB0 0 Anti B	111	4 bis 8	1024 bis 2048

3.2.2 NORMWERTE DES KOLLEKTIVS „PATIENT“

Nebenstehende Tabelle 4 zeigt die ermittelten Normwerte für das Titerende der Gruppe „Patient“. Hierfür wurden die Ergebnisse aller Patienten ($n = 307$) nach der Blutgruppenzugehörigkeit in die Gruppen A1, A2, B und 0 aufgeteilt und Normwerte für die jeweiligen Antikörper berechnet.

Abkürzungen:

„sp p A1 Anti B“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Patient, Blutgruppe A1, Antikörpertiter Anti B

„sp p A2 Anti B“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Patient, Blutgruppe A2, Antikörpertiter Anti B

„sp p B Anti A1“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Patient, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A1

„sp p B Anti A2“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Patient, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A2

„sp p 0 Anti A1“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Patient, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A1

„sp p 0 Anti A2“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Patient, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A2

„sp p 0 Anti B“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Patient, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti B

Tabelle 4. Normwerte des Kollektivs „Patient“

Kollektiv	n	Titerstufe	
		Untere Grenze 1/	Obere Grenze 1/
Spender / Patient Gruppe Patient A1			
NaCl-Röhrchen sp p A1 Anti B	67	(1)	(128)
NaCl-Karte sp p A1 Anti B	67	0 bis 1	128 bis 512
IgG Coombs-Karte sp p A1 Anti B	67	0 bis 1	128 bis 512
Spender / Patient Gruppe Patient A2			
NaCl-Röhrchen sp p A2 Anti B	79	(2)	(256)
NaCl-Karte sp p A2 Anti B	79	1 bis 2	128 bis 256
IgG Coombs-Karte sp p A2 Anti B	79	2 bis 4	256 bis 512
Spender / Patient Gruppe Patient B Anti A1			
NaCl-Röhrchen sp p B Anti A1	89	(4)	(256)
NaCl-Karte sp p B Anti A1	89	2 bis 4	256 bis 512
IgG Coombs-Karte sp p B Anti A1	89	(4)	(256)
Spender / Patient Gruppe Patient B Anti A2			
NaCl-Röhrchen sp p B Anti A2	89	0 bis 2	64 bis 128
NaCl-Karte sp p B Anti A2	89	0	64 bis 128
IgG Coombs-Karte sp p B Anti A2	89	0	32 bis 128
Spender / Patient Gruppe Patient 0 Anti A1			
NaCl-Röhrchen sp p 0 Anti A1	72	(4)	(256)
NaCl-Karte sp p 0 Anti A1	72	4 bis 8	512 bis 2048
IgG-Coombs-Karte sp p 0 Anti A1	72	(16)	(4096)
Spender / Patient Gruppe Patient 0 Anti A2			
NaCl-Röhrchen sp p 0 Anti A2	72	(1)	(256)
NaCl-Karte sp p 0 Anti A2	72	0 bis 2	512 bis 1024
IgG-Coombs-Karte sp p 0 Anti A2	72	1 bis 8	2048 bis 8192
Spender / Patient Gruppe Patient 0 Anti B			
NaCl-Röhrchen sp p 0 Anti B	72	(2)	(128)
NaCl-Karte sp p 0 Anti B	72	2 bis 4	256 bis 512
IgG-Coombs-Karte sp p 0 Anti B	72	4 bis 16	1024 bis 2048

3.2.3 NORMWERTE DES KOLLEKTIVS „SPENDER“

Nebenhstehende Tabelle 5 zeigt die ermittelten Normwerte für das Titerende der Gruppe „Spender“. Hierfür wurden die Ergebnisse aller Spender (n = 142) nach der Blutgruppenzugehörigkeit in die Gruppen A1, A2, B und 0 aufgeteilt und Normwerte für die jeweiligen Antikörper berechnet.

Abkürzungen:

„sp s A1 Anti B“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Spender, Blutgruppe A1, Antikörpertiter Anti B

„sp s A2 Anti B“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Spender, Blutgruppe A2, Antikörpertiter Anti B

„sp s B Anti A1“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Spender, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A1

„sp s B Anti A2“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Spender, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A2

„sp s 0 Anti A1“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Spender, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A1

„sp s 0 Anti A2“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Spender, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A2

„sp s 0 Anti B“ = Kollektiv Spender/Patient, Gruppe Spender, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti B

Tabelle 5. Normwerte des Kollektivs „Spender“

Kollektiv	n	Titerstufe	
		Untere Grenze 1/	Obere Grenze 1/
Spender / Patient Gruppe Spender A1			
NaCl-Röhrchen sp s A1 Anti B	41	(8)	(256)
NaCl-Karte sp s A1 Anti B	41	(2)	(128)
IgG Coombs-Karte sp s A1 Anti B	41	(2)	(128)
Spender / Patient Gruppe Spender A2			
NaCl-Röhrchen sp s A2 Anti B	32	(4)	(512)
NaCl-Karte sp s A2 Anti B	32	(4)	(512)
IgG Coombs-Karte sp s A2 Anti B	32	(4)	(512)
Spender / Patient Gruppe Spender B Anti A1			
NaCl-Röhrchen sp s B Anti A1	30	(8)	(512)
NaCl-Karte sp s B Anti A1	30	(4)	(128)
IgG Coombs-Karte sp s B Anti A1	30	(2)	(256)
Spender / Patient Gruppe Spender B Anti A2			
NaCl-Röhrchen sp s B Anti A2	30	(1)	(128)
NaCl-Karte sp s B Anti A2	30	(0)	(32)
IgG Coombs-Karte sp s B Anti A2	30	(0)	(32)
Spender / Patient Gruppe Spender 0 Anti A1			
NaCl-Röhrchen sp s 0 Anti A1	39	(1)	(512)
NaCl-Karte sp s 0 Anti A1	39	(16)	(1024)
IgG-Coombs-Karte sp s 0 Anti A1	39	(2)	(512)
Spender / Patient Gruppe Spender 0 Anti A2			
NaCl-Röhrchen sp s 0 Anti A2	39	1 bis 2	128 bis 256
NaCl-Karte sp s 0 Anti A2	39	(0)	(256)
IgG-Coombs-Karte sp s 0 Anti A2	39	(1)	(1024)
Spender / Patient Gruppe Spender 0 Anti B			
NaCl-Röhrchen sp s 0 Anti B	39	(2)	(256)
NaCl-Karte sp s 0 Anti B	39	(2)	(512)
IgG-Coombs-Karte sp s 0 Anti B	39	(8)	(2048)

3.2.4 NORMWERTE DES KOLLEKTIVS „ALT“

Nebensiehende Tabelle 6 zeigt die ermittelten Normwerte für das Titerende der Gruppe „Alt“. Hierfür wurden die Ergebnisse des Kollektivs „Alt“ (n = 169) nach der Blutgruppenzugehörigkeit in die Gruppen A1, A2, B und 0 aufgeteilt und Normwerte für die jeweiligen Antikörper berechnet.

Abkürzungen:

„aj a A1 Anti B“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe alt, Blutgruppe A1, Antikörpertiter Anti B

„aj a A2 Anti B“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe alt, Blutgruppe A2, Antikörpertiter Anti B

„aj a B Anti A1“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe alt, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A1

„aj a B Anti A2“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe alt, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A2

„aj a 0 Anti A1“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe alt, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A1

„aj a 0 Anti A2“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe alt, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A2

„aj a 0 Anti B“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe alt, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti B

Tabelle 6. Normwerte des Kollektivs „Alt“

Kollektiv	n	Titerstufe Ende	
		Untere Grenze 1/	Obere Grenze 1/
alt / jung Gruppe alt A1			
NaCl-Röhrchen aj a A1 Anti B	45	(1)	(128)
NaCl-Karte aj a A1 Anti B	45	(0)	(128)
IgG Coombs-Karte aj a A1 Anti B	45	0 bis 1	128 bis 512
alt / jung Gruppe alt A2			
NaCl-Röhrchen aj a A2 Anti B	40	(1)	(256)
NaCl-Karte aj a A2 Anti B	40	1 bis 2	128 bis 512
IgG Coombs-Karte aj a A2 Anti B	40	1 bis 4	128 bis 512
alt / jung Gruppe alt B Anti A1			
NaCl-Röhrchen aj a B Anti A1	43	(4)	(256)
NaCl-Karte aj a B Anti A1	43	(2)	(256)
IgG Coombs-Karte aj a B Anti A1	43	(4)	(256)
alt / jung Gruppe alt B Anti A2			
NaCl-Röhrchen aj a B Anti A2	43	(1)	(64)
NaCl-Karte aj a B Anti A2	43	0	32 bis 128
IgG Coombs-Karte aj a B Anti A2	43	(0)	(64)
alt / jung Gruppe alt 0 Anti A1			
NaCl-Röhrchen aj a 0 Anti A1	41	(4)	(256)
NaCl-Karte aj a 0 Anti A1	41	(4)	(1024)
IgG Coombs-Karte aj a 0 Anti A1	41	(16)	(8192)
alt / jung Gruppe alt 0 Anti A2			
NaCl-Röhrchen aj a 0 Anti A2	41	(0)	(128)
NaCl-Karte aj a 0 Anti A2	41	0 bis 2	256 bis 1024
IgG Coombs-Karte aj a 0 Anti A2	41	1 bis 8	2048 bis 16384
alt / jung Gruppe alt 0 Anti B			
NaCl-Röhrchen aj a 0 Anti B	41	(2)	(128)
NaCl-Karte aj a 0 Anti B	41	(2)	(512)
IgG Coombs-Karte aj a 0 Anti B	41	4 bis 16	1024 bis 2048

3.2.5 NORMWERTE DES KOLLEKTIVS „JUNG“

Nebenstehende Tabelle 7 zeigt die ermittelten Normwerte für das Titerende der Gruppe „Jung“. Hierfür wurden die Ergebnisse des Kollektivs „Jung“ (n = 280) nach der Blutgruppenzugehörigkeit in die Gruppen A1, A2, B und 0 aufgeteilt und Normwerte für die jeweiligen Antikörper berechnet.

Abkürzungen:

„aj j A1 Anti B“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe jung, Blutgruppe A1, Antikörpertiter Anti B

„aj j A2 Anti B“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe jung, Blutgruppe A2, Antikörpertiter Anti B

„aj j B Anti A1“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe jung, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A1

„aj j B Anti A2“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe jung, Blutgruppe B, Antikörpertiter Anti A2

„aj j 0 Anti A1“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe jung, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A1

„aj j 0 Anti A2“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe jung, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti A2

„aj j 0 Anti B“ = Kollektiv alt/jung, Gruppe jung, Blutgruppe 0, Antikörpertiter Anti B

Tabelle 7. Normwerte des Kollektivs „Jung“

Kollektiv	n	Titerstufe	
		Untere Grenze 1/	Obere Grenze 1/
alt / jung Gruppe jung A1			
NaCl-Röhrchen aj j A1 Anti B	63	2 bis 4	256 bis 512
NaCl-Karte aj j A1 Anti B	63	1 bis 2	128 bis 256
IgG Coombs-Karte aj j A1 Anti B	63	(1)	(256)
alt / jung Gruppe jung A2			
NaCl-Röhrchen aj j A2 Anti B	71	2 bis 4	256 bis 512
NaCl-Karte aj j A2 Anti B	71	2 bis 4	256 bis 512
IgG Coombs-Karte aj a A2 Anti B	71	2 bis 4	256 bis 512
alt / jung Gruppe jung B Anti A1			
NaCl-Röhrchen aj j B Anti A1	76	4 bis 8	256 bis 512
NaCl-Karte aj j B Anti A1	76	2 bis 4	128 bis 256
IgG Coombs-Karte aj j B Anti A1	76	(4)	(256)
alt / jung Gruppe jung B Anti A2			
NaCl-Röhrchen aj j B Anti A2	76	0 bis 2	64 bis 128
NaCl-Karte aj j B Anti A2	76	0	64 bis 128
IgG Coombs-Karte aj j B Anti A2	76	0	64 bis 128
alt / jung Gruppe jung 0 Anti A1			
NaCl-Röhrchen aj j 0 Anti A1	70	4 bis 8	256 bis 512
NaCl-Karte aj j 0 Anti A1	70	2 bis 8	512 bis 1024
IgG Coombs-Karte aj j 0 Anti A1	70	(16)	(2048)
alt / jung Gruppe jung 0 Anti A2			
NaCl-Röhrchen aj j 0 Anti A2	70	0 bis 2	128 bis 256
NaCl-Karte aj j 0 Anti A2	70	0 bis 1	256 bis 512
IgG Coombs-Karte aj j 0 Anti A2	70	1 bis 4	1024 bis 4096
alt / jung Gruppe jung 0 Anti B			
NaCl-Röhrchen aj j 0 Anti B	70	(2)	(256)
NaCl-Karte aj j 0 Anti B	70	2 bis 4	256 bis 1024
IgG Coombs-Karte aj j 0 Anti B	70	4 bis 16	512 bis 2048

3.3 ZUSAMMENFASSUNG DER RELEVANTEN ERGEBNISSE

Nachfolgend eine Übersicht über die im klinischen Alltag relevanten Ergebnisse der Titerbestimmungen; den Titern des Gesamtkollektivs der NaCl-Kartenmethode.

Tabelle 8. Zusammenfassung der klinisch relevanten Ergebnisse

Kollektiv	n	Titerstufe	
		Untere Grenze 1/	Obere Grenze 1/
AB0 Gruppe A1			
NaCl-Karte AB0 A1 Anti B	108	0 bis 1	128 bis 256
AB0 Gruppe A2			
NaCl-Karte AB0 A2 Anti B	111	2 bis 4	256 bis 512
AB0 Gruppe B Anti A1			
NaCl-Karte AB0 B Anti A1	119	2 bis 4	128 bis 256
AB0 Gruppe B Anti A2			
NaCl-Karte AB0 B Anti A2	119	0	64 bis 128
AB0 Gruppe 0 Anti A1			
NaCl-Karte AB0 0 Anti A1	111	2 bis 8	512 bis 1024
AB0 Gruppe 0 Anti A2			
NaCl-Karte AB0 0 Anti A2	111	0 bis 2	256 bis 512
AB0 Gruppe 0 Anti B			
NaCl-Karte AB0 0 Anti B	111	2 bis 4	256 bis 512

4 DISKUSSION

4.1 METHODENVERGLEICH

4.1.1 KEIN UNTERSCHIED DER SENSITIVITÄT VON NaCl-RT UND NaCl-GT

Wie unter 3.1 beschrieben, ergab sich beim Vergleich der herkömmlichen Röhrenmethode und der neueren Gelkartentechnik bezüglich der Sensitivität für Isoagglutinine keine eindeutige Tendenz (siehe 3.1, **Tabelle 2**). Die Antikörpertiter der Blutgruppen A1 und B waren signifikant höher bei der Röhrenmethode, die der Blutgruppe 0 fast immer signifikant höher in der Kartenmethode. Bei Blutgruppe A2 konnte meist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahren beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich beide Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität für Isoagglutinine ebenbürtig sind und widerlegen die Hypothese, dass die Gelkartenmethode die sensitivere Nachweismethode darstellt.

Stellt sich in einem Labor die Frage, ob der Isoagglutininnachweis standardmäßig von der herkömmlichen Röhrenmethode auf die modernen Gelkarten umgestellt werden soll, ist die von den Herstellern der Gelkarten beworbene deutlich höhere Sensitivität allenfalls bei Antikörpern außerhalb des AB0-Systems relevant. Allerdings bestehen zwischen den beiden Nachweisverfahren noch weitere Unterschiede, die bei einer Entscheidung in Betracht gezogen werden sollten.

4.1.2 UNTERSCHIEDE DER BEIDEN NACHWEISMETHODEN

4.1.2.1 MENGENVERGLEICH DER BENÖTIGTEN REAGENZIEN

Man benötigt für den Röhrennachweis die doppelte Menge an Testerythrozyten und die vierfache Menge an Patientenserum als für die Gelkarte. Müssen häufig aufeinanderfolgend Titeruntersuchungen durchgeführt werden, z. B. im Vorfeld einer AB0-inkompatiblen Transplantation, spricht dies für die Wahl der Gelkarte, um unnötige zusätzliche Blutentnahmen zu vermeiden. Insbesondere bei der AB0-inkompatiblen Transplantation bei Kindern ist ein geringer Bedarf an Patientenserum bzw. -plasma von Vorteil für die Patienten.

4.1.2.2 KOSTENVERGLEICH

Ein Nachteil der Gelkarte ist, dass sie im Vergleich zu den günstigen Glasröhrchen die teurere Variante darstellt. Da für die Gelkarten aber eine geringere Menge an Reagenzien benötigt wird, sind die Kosten insgesamt vergleichbar. Der Kostenfaktor stellt also heutzutage kein Argument mehr für die Glasröhrchentechnik dar.

4.1.2.3 OBJEKTIVITÄT UND STANDARDISIERUNG

Bei der Auswertung der Agglutination in den Glasröhrchen wird ein gutes Maß an Erfahrung benötigt. Die Agglutinate „kleben“ direkt nach der Zentrifugation am Boden des Glasröhrchens und müssen für die Auswertung über dem Lichtkasten durch leichtes Rollen auf einer glatten Unterlage mobilisiert werden. Je nach dem Grad der Agglutination zerfällt der Clot auf dem Boden des Röhrchens in mehrere bis zahlreiche kleinere Agglutinate oder es zeigen sich keine Agglutinate. Ein objektiver Vergleich der Titer kann also nur bei standardisiert gleicher Behandlung der zentrifugierten Glasröhrchen durch die Untersucher gewährleistet werden. Die Verfahren unterscheiden sich besonders stark bei den IgG-Coombs-Karten und den Neutr-AB® II-Röhrchen. Bei den Röhrchen muss das Coombs-Serum extra dazugegeben werden und die Röhrchen müssen in einem zusätzlichen Schritt in einer speziellen Waschzentrifuge behandelt werden. Dieses Verfahren beinhaltet neben einem deutlichen Mehraufwand auch die Gefahr einer höheren Fehlerquelle bzw. einer geringeren Objektivität bei verschiedenen Untersuchern.

Bei den Gelkarten ist nach der Zentrifugation keine Mobilisation mehr nötig bzw. muss sogar vermieden werden. Die Karten werden sofort vorsichtig auf den Lichtkarten gelegt und ausgewertet. Durch das Aufhalten der unterschiedlich großen Agglutinate im Gel entsteht ein Muster in den kleinen Plastikküvetten, das eindeutig in Grad 1-4 der Agglutination eingeteilt werden kann. Eine individuell leicht abweichende Interpretation des Ergebnisses wird somit weitestgehend vermieden. Darüber hinaus bleibt das Agglutinationsmuster in den Gelkarten länger stabil und kann dadurch einfacher dokumentiert werden. Kumlien et al. führten 2007 eine Studie durch, bei der eine Isoagglutininbestimmung gleicher Blutproben in verschiedenen Zentren (Stockholm, Uppsala und Freiburg) zu signifikant unterschiedlichen Titern führte; bei der Röhrchenmethode zu deutlich stärkeren Abweichungen als bei der Gelkartenmethode.⁷³ Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Lim et al. 2014, als sie in einem Ringversuch 68 koreanische Labore identische Blutproben mit der Röhrchen- und Gelkartenmethode auswerten ließen. Es fand sich eine signifikant geringere Streuung der Ergebnisse zwischen den Laboren unter den mit der Gelkartenmethode ausgewerteten Titern.⁷⁴ Shirey et al. kamen 2010 bei einem Vergleich der Röhrchen- und Kartenmethode an 50 Proben zu dem Ergebnis, dass sich die beiden Methoden bezüglich der Sensitivität die Waage halten, geben aber der Gelkartenmethode aufgrund der schnelleren Durchführbarkeit ebenfalls den Vorzug.⁷⁵

4.1.2.4 RATIONALISIERUNG

Zusätzlich zur besseren Objektivität der Gelkarten zeigt sich bei ihnen noch ein weiterer nicht zu vernachlässigender Vorteil. Dadurch, dass in den Gelkarten NaCl beziehungsweise NaCl und Coombs-Serum bereits vorgelegt ist, wird ein Pipettierschritt eingespart und die Titerbestimmung

beschleunigt. Die kleinen platzsparenden Gelkarten ermöglichen zudem eine rasche gleichzeitige Bearbeitung zahlreicher Titerreihen an einem Arbeitsplatz, womit Personal und Arbeitsfläche optimal genutzt werden können. Darüber hinaus besteht inzwischen auch die Möglichkeit, mit VidimScan®, einem Universal Lesegerät für Gel-ID-Karten, die Auswertung der Gelkarten einem Gerät zu überlassen.⁷⁶ Mit den neuesten Geräten (z. B. dem IH-1000® von BioRad) ist es sogar möglich, eine automatische Titrierung durchzuführen. Dadurch kann das Verfahren zusätzlich rationalisiert und objektiviert werden kann.

4.2 NEUTR-AB® II: METHODENDISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zum Nachweis von IgG im Serum getestet. Erstens eine additive Technik in Form von Gelkarten, die IgM und IgG additiv nachweist (IgG-Coombs-Karte, siehe 2.1.3.2). Zweitens eine Methode, bei der zunächst die im Serum vorhandenen IgM-Ak mittels Absorption abgefangen werden, damit nur die evtl. vorhandenen IgG-Ak für eine Reaktion zur Verfügung stehen (Neutr-AB® II-Methode, siehe 2.2.3).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit bei den additiven IgG-Coombs-Karten ein Vorhandensein von IgG-Ak bei bestimmten Blutgruppen nachzuweisen war, war bei der Röhrchenmethode mit Neutr-AB® II nur in seltensten Fällen eine Reaktion zu beobachten. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse war deshalb nicht möglich bzw. sinnvoll.

Ähnliche Erfahrungen machten Park et al., die bei einem Vergleich der Röhrchentechnik mit der Gelkartentechnik mit Kollektiven von n=60 zu dem Ergebnis kamen, dass die Gelkartentechnik insgesamt sensitiver ist.⁷⁷ Insbesondere zeigte sich das bei den hohen IgG-Titern der Blutgruppe 0, die mit der IgG-Coombs-Karte deutlich besser nachgewiesen werden konnten, als mit der Röhrchentechnik.⁷⁷ Allerdings wurde in dieser Studie statt Neutr-AB® II Dithiothreitol (DTT) verwendet, um IgG-Ak nachzuweisen. DTT zerstört IgM-Ak, so dass nur IgG-Ak für eine Agglutinationsreaktion übrig bleiben.⁷⁸ Die Verwendung ist aber mühsam, zeitaufwändig und zerstört möglicherweise einen Teil der IgG-Antikörper.⁷⁸ Neutr-AB® II dagegen zerstört IgM-Antikörper nicht, sondern fängt IgM-Ak in einer Antigen-Antikörperreaktion ab, so dass im Idealfall nur noch IgG-Ak für eine Ag-Ak-Reaktion übrig bleiben.⁶² Problematisch dabei ist, dass möglicherweise nicht alle IgM-Antikörper neutralisiert wurden und konsekutiv ein falsch positiver IgG-Nachweis erfolgt; dies könnte in erster Linie bei einer Hyperimmunisierung der Fall sein.⁶²

Nach den Ergebnissen dieser Studie und ausgiebiger Literaturrecherche scheint sich somit die Methodik der Zerstörung bzw. Absorption oder Neutralisation von IgM-Antikörpern durch DTT oder Neutr-AB® II vor einer IgG-sensitiven Isoagglutininbestimmung nicht bewährt zu haben, da die Ergebnisse zu unzuverlässig sind und die Methode umständlich und zeitaufwändig

ist. Besser erscheint hier die additive Methode mit z. B. IgG-Coombs-Gelkarten, bei der bei hoher Sensitivität für IgG und IgM ein falsch negatives Ergebnis bei korrekter Durchführung kaum vorkommen dürfte.

4.3 NORMWERTE

Eine Isoagglutinititeruntersuchung mit höheren Fallzahlen im Gesamtkollektiv ($n > 100$ / Methode / Blutgruppe) und statistisch aussagekräftigen Fallzahlen ($n > 40$ / Methode / Blutgruppe) in klinisch relevanten Untergruppen (alt / jung, männlich / weiblich, gesund / krank) bei Erwachsenen war bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

Neben dem Vergleich der Röhrchen- und Gelkartenmethode war das Berechnen von Normwerten für Isoagglutinititer ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit. Verschiedene Zentren setzen für die Isoagglutinititer, die bei AB0-inkompatiblen Transplantationen akzeptiert werden, Titer von 1/4 oder weniger bis 1/32 oder weniger an.^{49,56,79} Zurzeit wird diskutiert, ob ein Maximaltiter für Anti-A/B-Ak angegeben werden kann, unter dem ein Einschluss in ein Protokoll zur präoperativen Isoagglutininreduktion z. B. durch Plasmapherese oder Immunadsorption noch sinnvoll ist. Denn die Titerreduktion vor einer Transplantation erhöht je nach der notwendigen Anzahl der Anwendungen das Komplikationsrisiko des Patienten und verlangt dem operativen Zentrum ein hohes Maß an Logistik und Flexibilität ab.^{49,79} In den kürzlich veröffentlichten Studien von Lawrence et al. (2013) sowie Chung et al. (2013) wird als Richtwert für eine sichere Transplantation ein IgG-Isoagglutinititer kleiner oder gleich 1/256 zu Beginn des Transplantationsprotokolls veranschlagt. Dabei wurde das Outcome von Patienten nach einer AB0-inkompatiblen Transplantation mit einem Isoagglutinititer kleiner oder gleich 1/256 verglichen mit dem Outcome von Patienten mit einem Isoagglutinititer größer oder gleich 1/512. Das Kollektiv mit den niedrigeren Titern zeigte ein signifikant besseres Outcome.^{56,80} Wilpert et al. (Freiburg) setzen als Grenze für eine erfolgversprechende Transplantation einen Isoagglutinititer für Anti-A/Anti-B-IgG von 1/4 am Tag der Transplantation an, sowie in der ersten Woche post-Tx erneute Immunadsorptionen bei einem Titer über 1/8, in der zweiten Woche über 1/16.⁵⁵ Im Bereich des AB0-inkompatiblen Lebendnierentransplantationsprogramms des KUMs an unserer Einrichtung wird am Tag der Transplantation ein IgM-Titer von 1/2 und ein IgG-Titer von 1/8 veranschlagt, der im Verlauf 1/4 (IgM) und 1/32 (IgG) nicht überschreiten sollte.

Nun stellte sich die Frage, in welchem Bereich sich die Titerhöhen der Isoagglutinine bei den Blutgruppen A1, A2, B und 0 in unserer Bevölkerung bewegen. Hierüber geben die in der vorliegenden Arbeit erstellten Normwerttabellen Auskunft.

Das größte Kollektiv dieser Arbeit mit jeweils $n > 100$ ist das Kollektiv AB0 alle. In diesem Kollektiv war es problemlos möglich, für nahezu alle Blutgruppen und Nachweismethoden einen Normwert zu berechnen, da die Anzahl der Proben hoch ($n > 100$) war und der Test auf Normalverteilung (nach D'Agostino-Pearson) fast immer bestanden wurde. Bei genauer Betrachtung lassen sich mehrere Aussagen über die Quantität der Isoagglutinine IgM und IgG im Agglutinationstest je nach Blutgruppe treffen.

4.3.1 BLUTGRUPPE A1

Blutgruppe A1 zeigt einen Isoagglutinititer von 1/128 bis 1/256 in allen drei Nachweismethoden. Da die NaCl-Karte und die IgG-Coombs-Karte exakt dieselbe Titerstufe erbringen, lässt sich daraus schließen, dass in der Blutgruppe A1 kein oder ein mit dieser Methode nicht nachweisbar geringer Anteil an IgG-Isoagglutininen vorhanden ist. Wäre IgG vorhanden, hätte sich in der IgG-Coombs-Karte eine höhere Titerstufe zeigen müssen, da diese Karte additiv IgM und IgG nachweist.

4.3.2 BLUTGRUPPE A2

In Blutgruppe A2 findet sich ein um eine Titerstufe höherer Isoagglutinititer als in Blutgruppe A1, also ein Titer mit der oberen Grenze 1/256 bis 1/512. Die IgG-Coombs-Karte zeigt keine höhere Titerstufe als die NaCl-Karte, ein IgG-Anteil ist also auch bei Blutgruppe A2 mit dieser Methodik nicht nachweisbar.

4.3.3 BLUTGRUPPE B

Blutgruppe B zeigt ähnlich hohe Titer wie BG A1, ein IgG-Anteil ist ebenfalls nicht nachweisbar. Es zeigt sich, dass Blutgruppe B signifikant weniger A2-Isoagglutinine (1/64 bis 1/128) als A1-Agglutinine (1/128 bis 1/256 beim Gelkartentest und 1/256 bis 1/512 Röhrchentest) bildet. Diese Beobachtung wurde bereits 1942 von Olbrich et al. beschrieben.⁸¹

4.3.4 BLUTGRUPPE 0

Ein deutlicher Unterschied zu den Blutgruppen A1, A2 und B zeigt sich bei Blutgruppe 0. Die IgM-Ak gegen die Antigene A1, A2 und B bewegen sich in einem ähnlichen Titerbereich wie die IgM-Ak der Blutgruppe A, B und 0. In der IgG-Coombs-Karte zeigt sich allerdings ein ausgeprägter Titerunterschied zur NaCl-Gelkarte. Dieser wird durch Isoagglutinine vom Typ IgG hervorgerufen, die in der IgG-Coombskarte additiv mit den IgM-Ak nachgewiesen werden. Es zeigt sich, dass der Isoagglutinititer in der Coombskarte bei Blutgruppe 0 für Anti-A2-Ak um vier Titerstufen (1/2048 bis 1/8192) höher ist als bei Blutgruppe A und B, bei Anti-B-Ak um zwei

Titerstufen (1/1024 bis 1/2048). Bei Anti-A1-Antikörper war das Ergebnis nicht signifikant. Stussi et al. wies 2005 mithilfe der Methode der Durchflusszytometrie nach, dass IgG-Isoagglutinine nahezu ausschließlich von Blutgruppe 0 gebildet werden. Blutgruppe A und B produzieren hauptsächlich IgM und nur in einem sehr geringen Anteil IgG-Antikörper.⁵⁹ Als einzige Blutgruppe des AB0-Systems zeigt somit die Blutgruppe 0 einen hohen, klinisch relevanten Isoagglutinititer vom Typ IgG.^{82,83}

4.3.5 INTERPRETATION

Aufgrund der niedrigeren Fallzahlen in den Untergruppen weisen die ermittelten Normwerte für die Untergruppen weniger häufig ausreichende Signifikanzniveaus auf, dennoch spiegeln sich die Normwerte in den gebildeten Untergruppen (Spender, Patient, alt, jung) wider. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Isoagglutinititer für IgM weitgehend unabhängig von der Blutgruppe in einem Bereich zwischen 1/2 und 1/512 bewegen. Da es sich um eine Normalverteilung entsprechend annähernd Gauß'scher Verteilungskurve bei logarithmischer (nicht linearer!) Auftragung handelt, wird sich die Mehrheit der tatsächlichen Werte zwischen diesen Grenzen befinden.

Als einzige Blutgruppe des AB0-Systems weist die Blutgruppe 0 einen hohen, klinisch relevanten Isoagglutinititer vom Typ IgG auf. Dies ist besonders im Hinblick auf die steigende Anzahl an AB0-inkompatiblen Transplantationen, bei AB0-Erythroblastosen sowie der Herstellung von Produkten mit humanen Immunglobulinen (z.B. bei iv-Immunglobulinen)⁸⁴ von besonderer Bedeutung (s.u.).

4.3.6 KLINISCHE ANWENDUNG DER ISOAGGLUTININTITER

4.3.6.1 TRANSPLANTATION

Bei der Host-versus-Graft-Reaktion / Graft failure handelt es sich um eine Abstoßungsreaktion des Empfängers, die sich gegen das Transplantat richtet. Sie tritt immer auf, wenn es sich um eine HLA- bzw. Blutgruppeninkompatible Transplantation handelt und muss durch konsequente lebenslange Immunsuppression verhindert werden. Besonders die Anti-AB0-IgG-Ak-Titer scheinen durch Induktion einer akuten und chronischen Abstoßungsreaktion einen Einfluss auf das Langzeitüberleben von AB0-inkompatiblen Transplantaten zu haben.⁸⁵

Die Graft-versus-host-Reaktion tritt nach Stammzelltransplantation bei malignen Erkrankungen des Knochenmarks auf. Dabei werden vom Transplantat IgM-Antikörper gegen körpereigene Antigene des Empfängers gebildet. Ein postoperatives Monitoring der Antikörpertiter ist ein guter Marker für eine Früherkennung dieser gefährlichen Komplikation (Letalität 25%) nach Stammzelltransplantation.⁸⁶

Einige Transplantationszentren setzten bei der Verbesserung des Überlebens eines AB0-inkompatiblen Transplantats auf eine präoperative Reduktion der Isoagglutinine IgG und IgM.⁸⁷ Die meisten Gruppen konzentrieren sich aber in erster Linie auf das Monitoring und die Reduktion von IgG-Isoagglutininen, um eine Host-versus-Graft-Reaktion zu vermeiden, da ihnen die Hauptrolle im Hinblick auf das Langzeitüberleben eines Transplantats zugesprochen wird.^{56,85,88} Shimmura et al. interpretieren ihre Ergebnisse zum Langzeitoutcome nach Nierentransplantation dahingehend, dass ein hoher anti-A/B-IgG-Ak-Titer ($>1/128$) vor der Organtransplantation ein Prädiktor für ein schlechtes Langzeitüberleben des Transplantats darstellt. Patienten mit einem hohen Prä-OP-IgG-Ak-Titer benötigten signifikant mehr Plasmapheresen zur Reduktion des Ak-Titers und auch nach der Transplantation erreichten sie schneller wieder einen Ak-Titer, der zu Abstoßungsreaktionen führte und das Überleben des Transplantats gefährdete. Diese Patienten scheinen immunologische „high responder“ zu sein, für die sich ein Regime mit potenteren Immunsuppressiva empfiehlt.⁸⁹

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Normwerttabellen zeigen, dass es sich bei Individuen mit hohen IgG-Ak-Titern um Vertreter der Blutgruppe 0 handelt. Hier ergibt sich die noch zu überprüfende Hypothese, ob diese Patienten bei einer AB0-inkompatiblen Transplantation einer besonders intensiven Prä-Tx-Titerreduktion sowie einer engmaschigen Titerkontrolle in der Nachsorge bedürfen bzw. ob dies zu einem signifikant besserem Outcome führen würde.

4.3.6.2 SCHWANGERSCHAFTSINKOMPATIBILITÄT

Bei der Schwangerschaftsinkompatibilität (engl. HDN für hemolytic disease of the newborn) handelt es sich um eine natürliche Form der AB0-Inkompatibilität.³⁹ Dabei treten plazentagängige IgG-Antikörper der Mutter gegen Antigen das A oder / und B in den fetalen Blutkreislauf über und verursachen eine Hämolyse der fetalen Erythrozyten. Folgen dieser Hämolyse können eine Anämie des ungeborenen Kindes mit konsekutiven Entwicklungsstörungen und ein Morbus hämolyticus neonatorum mit lebensgefährlichem Ikterus sein. Im Gegensatz zur Rhesus-Inkompatibilität, die erst nach Sensibilisierung der Mutter gegenüber dem Rhesus-Antigen relevant wird, treten circa die Hälfte der Fälle einer AB0-Inkompatibilität bereits bei der ersten Schwangerschaft auf. Der Verlauf ist bei weiteren Schwangerschaften nicht progredient wie bei der Rhesus-Inkompatibilität, sondern in der Regel gleichbleibend mild.^{39,90}

In der Kaukasischen Bevölkerung besteht bei circa einem Fünftel aller Schwangerschaften eine AB0-Inkompatibilität zwischen Mutter und Fetus, aber nur eine kleine Minderheit entwickelt eine symptomatische AB0-Erythroblastose. Diese entsteht typischerweise bei Müttern mit der Blutgruppe 0, denn sie produzieren genug IgG-Antikörper, um eine Hämolyse auszulösen. Ob-

wohl sie sehr selten sind, wurden aber auch Fälle einer AB0-Inkompatibilität bei Kindern mit Müttern der Blutgruppe A oder B beschrieben.⁹¹⁻⁹³

Um die Gefahr einer Schwangerschaftsinkompatibilität rechtzeitig zu erkennen, ist es Standard, im ersten Trimester (Schwangerschaftswoche 10-16) und im dritten Trimester (SSW 28) einen Antikörpersuchtest durchzuführen.⁹⁴ Dabei wird neben den Rhesus-Antikörpern auch nach selteneren Antikörpern z. B. gegen Kell, MNS, Duffy oder E gesucht, nicht aber gegen AB0-Antigene, da alle Suchzellen die Blutgruppe 0 aufweisen. Ohne vorherige nichtenterale Immunisierung (Bluttransfusion, abdominelles Trauma während der Schwangerschaft) kommen nur bei der Blutgruppe 0 natürlicherweise plazentagängige Anti-AB-IgG-Antikörper vor (siehe Normwerttabelle). Dies wird meist erst postpartal entdeckt, ist aber klinisch nicht bedeutsam. Denn insgesamt beeinträchtigen AB0-IgG-Antikörper die Entwicklung des Kindes eher selten, da die AB0-Ag auch an vielen anderen fetalen Zelloberflächen vorhanden sind und mit AB0-Ak besetzt werden, bevor diese an die fetalen Erythrozyten binden können. Darüber hinaus sind die AB0-Ag der fetalen Erythrozyten während der Schwangerschaft noch nicht vollständig entwickelt und weisen weniger Ak-Bindungsstellen auf.⁹⁵ Dennoch ist das frühzeitige Erkennen einer relevanten Schwangerschaftsinkompatibilität mittels regelmäßiger Titerkontrollen (außerhalb des AB0-Systems) und Sonographie notwendig, um im Falle einer maternofetalen Ak-Ag-Reaktion frühzeitig eingreifen zu können. Um Folgeschäden zu verhindern, können weitere diagnostische Maßnahmen wie eine Amniozentese oder das Gewinnen von Nabelschnurblut eingeleitet werden und das Vollbild eines Morbus hämolyticus neonatorum z. B. mittels intrauteriner Bluttransfusion vermindert werden.³⁹

4.3.6.3 INTRAVENÖSE IMMUNGLOBULINE (IVIG)

Isoagglutinine können auch bei der intravenösen Applikation von gepoolten humanen immunglobulinreichen Infusionen (IVIG) zum Problem werden. Antikörper-vermittelte hämolytische Reaktionen nach Therapie mit IVIG stellen eine seltene, aber mitunter schwerwiegende Nebenwirkung dar.^{84,96} Als potentieller Risikofaktor hierfür werden die Anti-A- und Anti-B- Isoagglutinine in den IVIG-Produkten vermutet, die nicht blutgruppenspezifisch verabreicht werden, da es sich um eine Mischung aus Plasma von Tausenden von Spendern handelt.⁹⁷ Weil die meisten Spender gemäß der Häufigkeitsverteilung der AB0-Blutgruppen weltweit Blutgruppe A und 0 besitzen, kann ein ausreichend hoher Anteil von Isoagglutininen im Endprodukt entstehen, der bei Empfängern der Blutgruppen A, B und AB zu hämolytischen Reaktionen führt.⁹⁷

Aktuell wird untersucht, ob eine Reduktion des Anteils der Isoagglutinine an den IVIGs durch Ausschluss von Spendern mit hohen Anti-A- und Anti-B-Titern möglich ist und ob dies zu einer verminderten Anzahl an hämolytischen Reaktionen führt. Siani et al. wiesen nach, dass

durch Ausschluss eines kleinen Anteils (6,8%) an Spendern mit hohen Titern (in diesem Fall definiert als eine Agglutination im IAT von >2 bei einer Verdünnung von $1/200$) zu einer Reduktion des Anti-A-Isoagglutinintiters um eine Titerstufe führte. In der quantitativen Messung mittels FACS zeigte sich eine Reduktion um nahezu die Hälfte.⁸⁴ McVey et al. dagegen haben in ihrer Studie einen so geringen Anteil (7 von 4600) an hohen IgG-Isoagglutinintitern mit mindestens $1/4000$ festgestellt, dass sie sich der Meinung, ein Ausschluss von Spenden mit diesen hohen Titern würde zu einer relevanten Reduktion der Isoagglutinine führen, nicht anschließen.⁹⁸ Eine Studie zum Zusammenhang zwischen der Reduktion der Isoagglutinine in IVIGs und hämolytischen Reaktionen als Nebenwirkung läuft aktuell in den USA.⁸⁴ Der finale Studienbericht wird für 2019 erwartet.⁹⁹ Die Ergebnisse sind aber zu unseren Normwertbestimmungen passend, bei denen hohe Isoagglutinintiter nur selten vorkommen.

4.3.7 „GUTE“ UND „SCHLECHTE“ BLUTGRUPPEN: WAS STECKT DAHINTER?

4.3.7.1 BLUTGRUPPENDIÄT

In der westlichen Welt weiß man seine eigene Blutgruppe nur im Ausnahmefall, z.B. wenn man regelmäßig Blut spendet, bei der Blutgruppenbestimmung beim Wehrdienst, nach einer Schwangerschaft oder nach einem Klinikaufenthalt. Für den Alltag spielt die eigene Blutgruppe in unseren Breiten nur eine untergeordnete Rolle. Anders ist dies in Asien, wo es nicht unüblich ist, bei Bewerbungen oder romantischen ersten Dates nach der Blutgruppe gefragt zu werden. Traditionell werden dort den Blutgruppen bestimmte Eigenschaften zugeschrieben, die Aufschluss über Ernährungsgewohnheiten, charakterliche Eigenschaften und Neigungen zu Krankheiten geben. Wissenschaftlich nachgewiesen werden konnte bis heute keine dieser Theorien, die Legenden halten sich aber hartnäckig.

Die Theorie einer blutgruppenspezifischen Ernährung wurde 1996 durch den amerikanischen Arzt Peter D'Adamo auch bei uns bekannt, seine Bücher und Nahrungsergänzungsmittel verkaufen sich bis heute gut. Ein wissenschaftlicher Nachweis für den tatsächlichen gesundheitlichen Nutzen der spezifischen Diät für die Gruppen A, B, AB und 0 gibt es bis heute nicht, aber das Einhalten der Diäten führt erfreulicherweise bei einigen der Probanden zu einer Gewichtsreduktion sowie einer Senkung der Blutfettwerte. Dieser Effekt zeigt sich allerdings auch, wenn sich z.B. Träger der Blutgruppe 0 nach der Diät für Blutgruppe A ernähren, ist also eher auf die bewusste Ernährung zurückzuführen, als auf die besonderen Bedürfnisse des Organismus der jeweiligen Blutgruppe.¹⁰⁰

4.3.7.2 BLUTGRUPPENASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN

Spannend dagegen ist das heutige Wissen um die vermehrte Assoziation bestimmter Erkrankungen mit den einzelnen Blutgruppen. Wissenschaftlich belegt ist z. B. die geringere Anfälligkeit von Trägern der Blutgruppe 0 für Malaria oder die deutlich verminderten Infektionsgefahr bzw. Gefahr eines schweren Krankheitsverlaufes für Cholera bei der Blutgruppe B.^{101,102} Dies spiegelt sich in einer hohen Prävalenz der Blutgruppe B im Gangesdelta in Bangladesch wieder, die vermutlich dem evolutionären Druck geschuldet ist.¹⁰³ Bezüglich Neoplasien scheint Blutgruppe 0 eine geringere Anfälligkeit für das Pankreas-Karzinom zu haben, aber eine vermehrte Neigung zu gastralen Ulcera bzw. dem Helicobacter-assoziierten Magenkarzinom.^{101,104} Interessant ist auch die verminderte Expression des Von-Willebrandt-Faktors (VWF) und Faktor VIII bei Trägern der Blutgruppe 0. Dies führt zu einer verminderten Thromboseneigung und konsekutiv geringerer Neigung zur koronaren Herzerkrankung. Allerdings besteht dafür ein leicht erhöhtes Risiko für Hämorrhagien.^{101,102,105} Dieser Zusammenhang zwischen der Verteilung der Blutgruppen in der Weltbevölkerung und blutgruppenspezifischen Erkrankungen hat in den letzten Jahren besonders in der Anthropologie zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Wanderbewegungen des Frühmenschen geführt und ist ein anschauliches Beispiel für den selektiven Druck der Evolution.¹⁰²

4.4 FAZIT UND AUSBLICK

Das Vorhandensein der Blutgruppenantigene auf Organen und Geweben macht das Wissen um sie unverzichtbar für die Organtransplantation. In den letzten Jahren rückten auch die Isoagglutinine wieder vermehrt ins Zentrum des Interesses, nämlich als wichtiger Laborparameter im Vorfeld von Organ- oder Knochenmarktransplantationen, die aufgrund des Organmangels zunehmend AB0-inkompatibel durchgeführt werden. Langzeitstudien über nach modernen Protokollen durchgeführte AB0-inkompatible Nierentransplantationen zeigten ein ebenso gutes Outcome wie vergleichbare AB0-kompatible Transplantationen.⁴⁹ Ein einheitliches Protokoll für den Einschluss in AB0-inkompatible Transplantationen und das postoperative Nachsorgeprogramm existiert bis heute allerdings nicht, die Verfahren von der Isoagglutininbestimmung bis hin zu den Verfahren der Titerreduktion und der postoperativen Überwachung der Titer sind je nach Land und transplantiertem Organ sehr heterogen.^{1,2}

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde hierfür im ersten Teil (Methodenvergleich) die Sensitivität zweier häufig in der Laborpraxis angewandter Nachweismethoden für Isoagglutinititer (Röhrchentests und Gelkartentests) anhand von Blutuntersuchungen (n=449) untersucht und

statistisch ausgewertet. Im zweiten Teil wurden anhand dieser Daten Normwerte für Isoagglutinititer für jede Blutgruppe des AB0-Systems und für verschiedene Kollektive vorgeschlagen.

4.4.1 ZUSAMMENFASSUNG METHODENVERGLEICH

Beim Vergleich der herkömmlichen Röhrenmethode und der neueren Gelkartentechnik ergab sich bezüglich der Sensitivität für Isoagglutinine kein eindeutiger Unterschied. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich beide Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität für Isoagglutinine ebenbürtig sind und widerlegen die unter 1.10. formulierte Hypothese, dass die Gelkartenmethode die sensitivere Nachweismethode darstellt.

Dieses Ergebnis kann als Entscheidungskriterium zwischen Röhrenmethode und Gelkartenmethode dienen, wenn sich beispielsweise in einem Labor die Frage stellt, ob der Isoagglutininnachweis standardmäßig von der herkömmlichen Röhrenmethode auf die modernen Gelkarten umgestellt werden soll.

4.4.2 ZUSAMMENFASSUNG NORMWERTE

Eine Isoagglutinititeruntersuchung mit hohen Fallzahlen im Gesamtkollektiv ($n > 100$ / Methode / Blutgruppe) und statistisch aussagekräftigen Fallzahlen ($n > 40$ / Methode / Blutgruppe) in klinisch relevanten Untergruppen (alt / jung, männlich / weiblich, gesund / krank) mit Normwerterstellung an Erwachsenen war bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

Neben dem Vergleich der Röhren- und Gelkartenmethode war das Berechnen von Normwerten für Isoagglutinititer ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit. Verschiedene Zentren setzen für die Isoagglutinititer, die bei AB0-inkompatiblen Transplantationen akzeptiert werden, Titer von 1/4 oder weniger bis 1/32 oder weniger an.^{49,56,79} Zurzeit wird diskutiert, ob ein Maximaltiter für Anti-A/B-Ak angegeben werden kann, unter dem ein Einschluss in ein Protokoll zur präoperativen Isoagglutininreduktion z. B. durch Plasmapherese oder Immunadsorption noch sinnvoll ist. Denn die Titerreduktion vor einer Transplantation erhöht je nach der notwendigen Anzahl der Anwendungen das Risiko des Patienten, ist zeitaufwändig und verlangt dem operativen Zentrum ein hohes Maß an Logistik ab.^{49,79} Je niedriger der präoperative Titer, desto besser das Outcome.^{56,80} Auch bei der Herstellung von IVIG könnte der Anteil an hohen Isoagglutinititern bei Spendern in Zukunft eine Rolle spielen, da die Isoagglutinine im Verdacht stehen, bei Empfängern eine hämolytische Reaktion auslösen zu können.^{84,97}

Die in der vorliegenden Arbeit erstellten Normwerttabellen (siehe Ergebnisteil) geben Auskunft über die Titerhöhen der Isoagglutinine bei den Blutgruppen A1, A2, B und 0 in unserer Bevölkerung. Statistisch signifikant bei hohen Fallzahlen in allen Untergruppen waren die Normwerte für die einzelnen Blutgruppen des AB0-Systems, zusammengefasst aus allen Unter-

gruppen mit $n=449$ und aufgeschlüsselt nach der Nachweismethode (NaCl-Röhrchen, NaCl-Gelkarte und IgG-Coombs-Gelkarte). Die klinisch relevantesten Ergebnisse (Titer der NaCl-Gelkartenmethode des Gesamtkollektivs AB0) wiesen dabei für Blutgruppe A1 einen Anti-B-Titer von 1/0-1 bis 1/128-256, für Blutgruppe A2 einen Anti-B-Titer von 1/2-4 bis 1/256-512, für Blutgruppe B einen Anti-A1-Titer von 1/2-4 bis 1/128-256 und einen Anti-A2-Titer von 1/0 bis 1/64-128, für Blutgruppe 0 einen Anti-A1-Titer von 1/2-8 bis 1/512-1024, einen Anti-A2-Titer von 1/0-2 bis 1/256-512 und einen Anti-B-Titer von 1/2-4 bis 1/256-512 auf.

Die meisten Forschungsgruppen konzentrieren sich in erster Linie auf das Monitoring und die Reduktion von IgG-Isoagglutininen, um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden, da IgG-Isoagglutininen die Hauptrolle im Hinblick auf das Langzeitüberleben eines Transplantats zugesprochen wird.^{56,85,88} Shimmura et al. interpretieren ihre Ergebnisse zum Langzeitoutcome nach Nierentransplantation dahingehend, dass ein hoher Anti-A/B-IgG-Ak-Titer ($>1/128$) vor der Organtransplantation ein Prädiktor für ein schlechtes Langzeitüberleben des Transplantats darstellt.⁸⁹ Patienten mit einem hohen präoperativen IgG-Ak-Titer benötigten in ihren Untersuchungen signifikant mehr Plasmapheresen zur Reduktion des Ak-Titers und auch nach der Transplantation erreichten sie schneller wieder einen Ak-Titer, der zu Abstoßungsreaktionen führte und das Überleben des Transplantats gefährdete. Diese Patienten scheinen immunologische „high responder“ zu sein, für die in Zukunft ein Protokoll mit potenteren Immunsuppressiva entwickelt werden sollte.⁸⁹

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Normwerttabellen zeigen, dass es sich bei Individuen mit hohen IgG-Ak-Titern fast immer um Vertreter der Blutgruppe 0 handelt. Der Ruf nach einem einheitlichen Protokoll für die Vorbereitung und Nachsorgen bei AB0-inkompatiblen Transplantationen wird aktuell wieder lauter, da die Verfahren sich je nach Land und Transplantationszentrum teilweise deutlich unterscheiden. Die vorgeschlagenen Normwerte dieser Arbeit können helfen, das Outcome und den Aufwand AB0-inkompatibler Transplantationen bei verschiedenen Blutgruppen abzuschätzen und somit zur Entwicklung einheitlicher und effizienter Prozedere zum Einschluss- und Nachsorgeprogramm bei Transplantation beizutragen.

5 LITERATUR

1. Barnett ANR, Hudson A, Hadjianastassiou VG, Marks SD, Reid CJ, Maggs TP, Vaughan R, Mamode N. Distribution of ABO blood group antibody titers in pediatric patients awaiting renal transplantation: implications for organ allocation policy. *Transplantation* 2012;**94**: 362-8.
2. Berséus O, Boman K, Nessen SC, Westerberg LA. Risks of hemolysis due to anti-A and anti-B caused by the transfusion of blood or blood components containing ABO-incompatible plasma. *Transfusion* 2013;**53**: 114S-23S.
3. Baskett TF. James Blundell: the first transfusion of human blood. *Resuscitation* 2002;**52**: 229-33.
4. Young JH. James Blundell (1790-1878), Experimental Physiologist and Obstetrician. *Med Hist* 1964;**8**: 159-69.
5. Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* 2009;**25**: 48-59.
6. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med* 2001;**11**: 243-65.
7. Kyle RA, Shampo MA. Karl Landsteiner--discoverer of the major human blood groups. *Mayo Clin Proc* 2001;**76**: 830.
8. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zbl Bakt* 1900;**27**: 357-62.
9. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute. *Win. Klin. Wschr.* 1901.14.-P: 1132-4.
10. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. *Transfusionsmedizin: Grundlagen - Therapie - Methodik*: Springer, 2004.
11. Eckstein R, Zimmermann R. *Immunhämatologie und Transfusionsmedizin: Theorie und Praxis kompakt*: Urban & Fischer bei Elsev, 2010.
12. Farr AD. Blood group serology--the first four decades (1900--1939). *Med Hist* 1979;**23**: 215-26.
13. Dabelsteen E, Fejerskov O. Distribution of blood group antigen A in human oral epithelium. *Scand J Dent Res* 1974;**82**: 206-11.
14. Yamakami K. The individuality of semen, with reference to its property of inhibiting specifically isohemoagglutination. *The Journal of Immunology* 1926;**12**: 185-9.
15. Yosida K-I. Über die gruppenspezifischen Unterschiede der Transsudate, Exsudate, Sekrete, Exkrete, Organextrakte und Organzellen des Menschen und ihre rechtsmedizinischen Anwendungen. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* 1928;**63**: 331-9.
16. Putkonen T. Über die Gruppenspezifischen Eigenschaften verschiedener Körperflüssigkeiten: Akad. Abh, 1930.
17. Lehrs H. Ueber gruppenspezifische Eigenschaften des menschlichen Speichels: Fischer, 1930.
18. Clausen H, Hakomori S, Graem N, Dabelsteen E. Incompatible A antigen expressed in tumors of blood group O individuals: immunochemical, immunohistologic, and enzymatic characterization. *J Immunol* 1986;**136**: 326-30.
19. Rydberg L. ABO-incompatibility in solid organ transplantation. *Transfusion Medicine* 2001;**11**: 325-42.
20. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*: Thieme, 2006.
21. Brown J. Edward Jenner and vaccination. *J S C Med Assoc* 1996;**92**: 512.
22. Hammarsten JF, Tattersall W, Hammarsten JE. Who discovered smallpox vaccination? Edward Jenner or Benjamin Jesty? *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1979;**90**: 44-55.

23. Stanley WM. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science* 1935;**81**: 644-5.
24. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. *Brock Biology of Microorganisms*: Pearson Education, Limited, 2011.
25. Travers P, Walport M, Charles A Janeway J, Shlomchik M, Beutner L, Haüßer-Siller I, Seidler L. *Immunologie*: Spektrum Akad. Verlag, 2002.
26. Campbell NA, Reece JB. *Biology*: Pearson Education, 2005.
27. Perl A. Pathogenesis and spectrum of autoimmunity. *Methods Mol Biol* 2012;**900**: 1-9.
28. Lutz HU, Bogdanova A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Frontiers in physiology* 2013;**4**.
29. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* 2008;**55**: 174-82.
30. Stenzel A, Bringmann G, Zeiler T. Der besondere Fall: Ein polytraumatisierter Patient mit der Blutgruppe Bombay. *Hämotherapie* 2011;**16**: 19-22.
31. Yamamoto F-i, McNeill PD, Hakomori S-i. Human histo-blood group A2 transferase coded by A2 allele, one of the a subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;**187**: 366-74.
32. Silva DC, Jovino CN, Silva CA, Fernandes HP, Filho MM, Lucena SC, Costa AM, Cesar CL, Barjas-Castro ML, Santos BS, Fontes A. Optical tweezers as a new biomedical tool to measure zeta potential of stored red blood cells. *PLoS One* 2012;**7**: e31778.
33. Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol* 2012;**188**: 939-45.
34. Coombs RR, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol* 1945;**26**: 255-66.
35. Moreschi C. Neue Tatsachen über die Blutkörperchenagglutination, 1908.
36. Czlonkowska A, Korlak J. The Immune Response During Aging. *Journal of Gerontology* 1979;**34**: 9-14.
37. Redman M, Malde R, Contreras M. Comparison of IgM and IgG Anti-A and Anti-B Levels in Asian, Caucasian and Negro Donors in the North West Thames Region. *Vox Sang* 1990;**59**: 89-91.
38. Grundbacher FJ. Genetics of Anti-A and Anti-B Levels. *Transfusion* 1976;**16**: 48-55.
39. Issitt PD, Anstee DJ. *Applied Blood Group Serology*: Montgomery Scientific Publications, 1998.
40. Grundbacher FJ. High IgM levels in women coincide with reproductive phase. *Experientia* 1980;**36**: 1360-1.
41. Rhodes K, Markham R, Maxwell P, Monk-Jones M. Immunoglobulins and the X-chromosome. *British medical journal* 1969;**3**: 439.
42. Washburn TC, Medearis DN, Childs B. Sex differences in susceptibility to infections. *Pediatrics* 1965;**35**: 57-64.
43. Allansmith M, McClellan BH, Butterworth M, Maloney JR. The development of immunoglobulin levels in man. *J Pediatr* 1968;**72**: 276-90.
44. Grundbacher FJ. Human X Chromosome Carries Quantitative Genes for Immunoglobulin M. *Science* 1972;**176**: 311-2.
45. Grundbacher F, Shreffler D. Effects of secretor, blood, and serum groups on isoantibody and immunoglobulin levels. *American journal of human genetics* 1970;**22**: 194.
46. Makinodan T, Adler WH. Effects of aging on the differentiation and proliferation potentials of cells of the immune system. In: Thorbecke GJ, ed. *Biology of Aging and Development*: Springer US, 1975:257-68.
47. Lesourd B. Nutritional factors and immunological ageing. *Proceedings of the Nutrition Society* 2006;**65**: 319-25.

48. Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B, Samartin S, Sanderson IR, Van Loo J, Vas Dias FW, Watzl B. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr* 2005;**94**: 452-81.
49. Fehr T, Stussi G. ABO-incompatible kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;**17**: 376-85.
50. Kauke T, Wittmann G, Schoenermarck U, Fischereder M, Illner W, Jauch K. Feasible relevance of Duffy and Kidd antigens for kidney transplantation: acute graft loss after third kidney transplantation due to red blood cell antibodies *Transplant International: Wiley-Blackwell Publishing, Inc Commerce Place, 350 Main St, Malden 02148, MA USA, 2010*:42-.
51. Paul LC, van Es LA, Baldwin Iii WM. Antigens in human renal allografts. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1981;**19**: 206-23.
52. Raja R, Bannett A, Caruana R, Baquero A. Removal of antibodies with immunoadsorption from an ABO incompatible recipient prior to renal transplant. *ASAIO Trans* 1986;**32**: 102-3.
53. Soejima Y, Muto J, Matono R, Ninomiya M, Ikeda T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Shirabe K, Maehara Y. Strategic breakthrough in adult ABO-incompatible living donor liver transplantation: preliminary results of consecutive seven cases. *Clinical Transplantation* 2013;**27**: 227-31.
54. Hur M, Moon H-W, Kwon S-W. ABO-incompatible kidney transplantation. Understanding the complexities of kidney transplantation. *InTech* 2011: 332-48.
55. Wilpert J, Geyer M, Pisarski P, Drognitz O, Schulz-Huotari C, Gropp A, Goebel H, Gerke P, Teschner S, Walz G, Donauer J. On-demand strategy as an alternative to conventionally scheduled post-transplant immunoadsorptions after ABO-incompatible kidney transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2007;**22**: 3048-51.
56. Lawrence C, Galliford JW, Willicombe MK, McLean AG, Lesabe M, Rowan F, Papalois V, Regan F, Taube D. Antibody Removal Before ABO-Incompatible Renal Transplantation: How Much Plasma Exchange Is Therapeutic? *Transplantation* 2011;**92**: 1129-33 10.097/TP.0b013e31823360cf.
57. Sheppard D, Tay J, Bryant A, McDiarmid S, Huebsch L, Tokessy M, Hamelin L, Saidenberg E, Bredeson C. Major ABO-incompatible BMT: isohemagglutinin reduction with plasma exchange is safe and avoids graft manipulation. *Bone Marrow Transplant* 2013.
58. Stussi G, Muntwyler J, Passweg JR, Seebach L, Schanz U, Gmür J, Gratwohl A, Seebach JD. Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;**30**: 87-93.
59. Stussi G, Huggel K, Lutz HU, Schanz U, Rieben R, Seebach JD. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. *Br J Haematol* 2005;**130**: 954-63.
60. Weisbach V, Kohnhauser T, Zimmermann R, Ringwald J, Strasser E, Zingsem J, Eckstein R. Comparison of the performance of microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strength solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies. *Transfus Med* 2006;**16**: 276-84.
61. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, Drot C. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990;**30**: 109-13.
62. Medion Diagnostics AG. Neutr-AB® II (Packungsbeilage), 2006.
63. Kimura S, Yurugi K, Segawa H, Kuroda J, Sato K, Nogawa M, Yuasa T, Egawa H, Tanaka K, Maekawa T. Rapid quantitation of immunoglobulin G antibodies specific for blood group antigens A and B by surface plasmon resonance. *Transfusion* 2005;**45**: 56-62.

64. Buchs J-P, Nydegger UE. Development of an ABO-ELISA for the quantitation of human blood group anti-A and anti-B IgM and IgG antibodies. *Journal of Immunological Methods* 1989;**118**: 37-46.
65. Rieben R, Bbuchs JP, Flückiger E, Nydegger UE. Antibodies to histo-blood group substances A and B: agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories. *Transfusion* 1991;**31**: 607-15.
66. Sharon R, Fibach E. Quantitative flow cytometric analysis of ABO red cell antigens. *Cytometry* 1991;**12**: 545-9.
67. Bücherl C. *Kriterien für Zulassung & Ausschluss vom Blutspenden [monograph on the internet]*. <http://www.blutspende-plasmaspende.de/zulassung-ausschluss/kriterien-fur-zulassung-ausschluss-vom-blutspenden/>
68. DiaMed AG. Testerythrozyten für das ID-Micro Typing System für Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest: ID-DiaCell ABO / I, II und ID-DiaCell ABO / I, II, III.
69. Schönhage KO. Particle Gel Immuno Assay (ID-PaGIA) zum Nachweis von anti-IgA Antikörpern: Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät-Universitätsklinikum Charité, 2005.
70. DiaMed Diagnostika. Yves Lapierre: Prinzip des Geltests. In: Schürmann-Däumer C, ed.
71. Horowitz GL. CLSI C28-A3: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Third ed, 2008.
72. Tukey JW. *Exploratory data analysis* 1977.
73. Kumlien G, Wilpert J, Safwenberg J, Tyden G. Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation* 2007;**84**: S17-9.
74. Lim Y, Kang SJ. Standardization of ABO Antibody Titer Measurement at Laboratories in Korea. *Annals of laboratory medicine* 2014;**34**: 456-62.
75. Shirey RS, Cai W, Montgomery RA, Chhibber V, Ness PM, King KE. IMMUNOHEMATOLOGY: Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Transfusion* 2010;**50**: 631-4.
76. VIDIMSOFT bvba. *VidimScan - Specifications [monograph on the internet]*. 2013. <http://vidimsoft.com/wp-content/themes/vidimsoft/documents/producten/downloadVSDU.php>
77. Park ES, Jo KI, Shin JW, Park R, Choi TY, Bang HI, Chai GR, Yun SG. Comparison of Total and IgG ABO Antibody Titers in Healthy Individuals by Using Tube and Column Agglutination Techniques. *Annals of laboratory medicine* 2014;**34**: 223-9.
78. Kang SJ, Lim YA, Baik SY. Comparison of ABO antibody titers on the basis of the antibody detection method used. *Ann Lab Med* 2014;**34**: 300-6.
79. Wahrmann M, Schiemann M, Marinova L, Körmöczí GF, Derfler K, Fehr T, Stussi G, Böhmig GA. Anti-A/B antibody depletion by semiselective versus ABO blood group-specific immunoadsorption. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012;**27**: 2122-9.
80. Chung BH, Lim JU, Kim Y, Kim JI, Moon IS, Choi BS, Park CW, Kim YS, Yang CW. Impact of the Baseline Anti-A/B Antibody Titer on the Clinical Outcome in ABO-Incompatible Kidney Transplantation. *Nephron Clin Pract* 2013;**124**: 79-88.
81. Jungmichel, Mayser, Schloßberger, Pietrusky, Plath W, Inouye T, v N, Sjövall E, Kürten, Rintelen K, Voss. Serologie. Blutgruppen. Bakteriologie und Immunitätslehre. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin* 1942;**35**: 140-5.
82. Toki D, Ishida H, Horita S, Yamaguchi Y, Tanabe K. Blood group O recipients associated with early graft deterioration in living ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation* 2009;**88**: 1186-93.
83. Bakkeheim E, Bergerud U, Schmidt-Melbye A-C, Akkøk ÇA, Liestøl K, Fugelseth D, Lindemann R. Maternal IgG anti-A and anti-B titres predict outcome in ABO-incompatibility in the neonate. *Acta Pædiatrica* 2009;**98**: 1896-901.

84. Siani B, Willimann K, Wymann S, Marques Antunes A, Widmer E. Donor screening reduces the isoagglutinin titer in immunoglobulin products. *Transfusion* 2015;**55**: S95-S7.
85. Toma H, Tanabe K, Tokumoto T. Long-term outcome of ABO-incompatible renal transplantation. *Urol Clin North Am* 2001;**28**: 769-80.
86. Zaimoku Y, Takami A, Sato H, Utsumi M, Nakao S. IgM anti-recipient ABO antibodies predict acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Hematology* 2013;**98**: 96-101.
87. Kim JM, Kwon CHD, Joh J-W, Kang E-S, Park JB, Lee JH, Kim SJ, Paik SW, Lee S-K, Kim DW. ABO-incompatible living donor liver transplantation is suitable in patients without ABO-matched donor. *Journal of Hepatology* 2013.
88. Tyden G, Kumlien G, Genberg H, Sandberg J, Lundgren T, Fehrman I. ABO-incompatible kidney transplantation and rituximab. *Transplant Proc* 2005;**37**: 3286-7.
89. Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, Takahashi K, Toma H. Role of anti-A/B antibody titers in results of ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation* 2000;**70**: 1331-5.
90. Narang A, Jain N. Haemolytic disease of newborn. *Indian J Pediatr* 2001;**68**: 167-72.
91. Wang M, Hays T, Ambruso DR, Silliman CC, Dickey WC. Hemolytic disease of the newborn caused by a high titer anti-group B IgG from a group A mother. *Pediatric Blood & Cancer* 2005;**45**: 861-2.
92. Haque KM, Rahman M. An unusual case of ABO-haemolytic disease of the newborn. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 2000;**26**: 61-4.
93. Jeon H, Calhoun B, Pothiwala M, Herschel M, Baron BW. Significant ABO hemolytic disease of the newborn in a group B infant with a group A2 mother. *Immunohematology* 2000;**16**: 105-8.
94. Gooch A, Parker J, Wray J, Qureshi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *Transfusion Medicine* 2007;**17**: 252-62.
95. Grundbacher FJ. The Etiology of ABO Hemolytic Disease of the Newborn. *Transfusion* 1980;**20**: 563-8.
96. Daw Z, Padmore R, Neurath D, Cober N, Tokessy M, Desjardins D, Olberg B, Tinmouth A, Giulivi A. Hemolytic transfusion reactions after administration of intravenous immune (gamma) globulin: a case series analysis. *Transfusion* 2008;**48**: 1598-601.
97. Branch DR. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? *Transfusion* 2015;**55 Suppl 2**: S74-9.
98. McVey J, Baker D, Parti R, Berg R, Gudino M, Teschner W. Anti-A and anti-B titers in donor plasma, plasma pools, and immunoglobulin final products. *Transfusion* 2015;**55 Suppl 2**: S98-S104.
99. Martinez C. *Privigen® use and haemolytic anaemia in adults and children and the Privigen® safety profile in children with CIDP - an observational hospital-based cohort study in the US [monograph on the internet]*. <http://www.encepp.eu/encepp/viewResource.htm?id=6515>
100. Wang J, García-Bailo B, Nielsen DE, El-Sohemy A. ABO Genotype, 'Blood-Type' Diet and Cardiometabolic Risk Factors 2014.
101. Franchini M, Bonfanti C. Evolutionary aspects of ABO blood group in humans. *Clinica Chimica Acta* 2015;**444**: 66-71.
102. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood* 2010;**115**: 4635-43.
103. Glass RI, Holmgren J, Haley CE, Khan MR, Svennerholm AM, Stoll BJ, Belayet Hossain KM, Black RE, Yunus M, Barua D. Predisposition for cholera of individuals with O blood group possible evolutionary significance. *American journal of epidemiology* 1985;**121**: 791-6.
104. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993;**262**: 1892-5.

105. Jenkins PV, O'Donnell JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion* 2006;**46**: 1836-44.

6 ANHANG TABELLENWERK ROHDATEN

6.1 EINTEILUNG DER ROHDATEN

In der folgenden Tabelle ist das Untersuchungsdatum aller 449 Blutproben aufgelistet, sowie das Geburtsjahr des Probanden, dessen Geschlecht (m männlich, w weiblich), Einteilung nach s Spender und p Patient, sowie die Blutgruppe (A1, A2, B oder 0).

#	Untersuchungsdatum	Geburtsjahr	Geschlecht	Spender / Patient	Blutgruppe
1	05.04.11	1983	w	s	A1
2	05.04.11	1981	m	s	A1
3	01.04.11	1960	m	s	A1
4	03.05.11	1970	m	s	B
5	03.05.11	1973	w	s	B
6	03.05.11	1987	m	s	B
7	03.05.11	1984	m	s	A1
8	03.05.11	1983	m	s	A1
9	03.05.11	1966	w	s	A1
10	04.05.11	1964	w	s	0
11	04.05.11	1961	m	s	0
12	04.05.11	1982	m	s	0
13	04.05.11	1970	w	s	A1
14	04.05.11	1973	m	s	A2
15	04.05.11	1973	w	s	A1
16	05.05.11	1986	w	s	0
17	05.05.11	1987	m	s	0
18	05.05.11	1963	m	s	A1
19	05.05.11	1963	w	s	A1
20	05.05.11	1965	m	s	A2
21	05.05.11	1982	w	s	A1
22	06.05.11	1949	m	s	0
23	06.05.11	1984	w	s	0
24	06.05.11	1984	w	s	0
25	06.05.11	1973	w	s	A2
26	06.05.11	1982	m	s	A2
27	10.05.11	1988	m	s	0
28	10.05.11	1985	w	s	0
29	10.05.11	1986	w	s	0
30	10.05.11	1984	m	s	0
31	10.05.11	1979	w	s	0
32	11.05.11	1968	m	s	A2
33	11.05.11	1990	w	s	A2
34	11.05.11	1987	w	s	B
35	18.05.11	1984	w	s	A2
36	18.05.11	1988	w	s	A2
37	18.05.11	1986	w	s	A2
38	18.05.11	1988	m	s	B
39	23.05.11	1976	m	s	B
40	23.05.11	1979	w	s	B
41	26.05.11	1946	m	p	A1
42	26.05.11	1937	w	p	A1
43	26.05.11	1942	m	p	A1
44	26.05.11	1936	w	p	A2
45	26.05.11	1944	w	p	A1
46	26.05.11	1956	m	p	0

47	25.05.11	1935	m	p	B
48	25.05.11	1943	m	p	B
49	25.05.11	1930	m	p	A2
50	25.05.11	1930	m	p	A1
51	25.05.11	1937	w	p	A1
52	25.05.11	1952	w	p	A1
53	23.05.11	1936	m	p	A1
54	23.05.11	1960	m	p	A1
55	23.05.11	1961	w	p	B
56	23.05.11	1940	m	p	0
57	23.05.11	1969	m	p	A1
58	23.05.11	1956	m	p	A2
59	23.05.11	1944	m	p	B
60	23.05.11	1938	m	p	B
61	23.05.11	1944	w	p	0
62	23.05.11	1941	w	p	A1
63	23.05.11	1938	m	p	A1
64	23.05.11	1954	m	p	0
65	23.05.11	1939	m	p	B
66	23.05.11	1975	m	p	0
67	23.05.11	1929	m	p	A1
68	18.05.11	1942	m	p	0
69	18.05.11	1923	w	p	A1
70	18.05.11	1939	w	p	0
71	18.05.11	1946	w	p	0
72	18.05.11	1935	w	p	A1
73	18.05.11	1941	w	p	B
74	18.05.11	1931	w	p	B
75	18.05.11	1977	w	p	A2
76	18.05.11	1940	m	p	A2
77	17.05.11	1936	m	p	A2
78	17.05.11	1948	w	p	A2
79	17.05.11	1990	m	p	0
80	17.05.11	1939	w	p	0
81	17.05.11	1959	w	p	0
82	17.05.11	1986	m	p	B
83	17.05.11	1933	m	p	B
84	17.05.11	1946	w	p	B
85	17.05.11	1939	w	p	A1
86	17.05.11	1960	m	p	0
87	17.05.11	1941	w	p	A1
88	12.05.11	1944	m	p	0
89	12.05.11	1964	m	p	0
90	12.05.11	1965	w	p	B
91	12.05.11	1941	w	p	B
92	12.05.11	1973	m	p	0
93	11.05.11	1929	m	p	A1
94	11.05.11	1969	w	p	B
95	11.05.11	1935	m	p	B
96	10.05.11	1951	m	p	0
97	02.05.11	1939	m	p	0
98	06.05.11	1931	w	p	A1
99	15.06.11	1948	m	p	B
100	15.06.11	1934	w	p	B
101	15.06.11	1928	m	p	0
102	15.06.11	1935	m	p	0
103	15.06.11	1927	w	p	A1
104	27.05.11	1941	m	p	A2

105	27.05.11	1951	m	p	B
106	27.05.11	1948	w	p	B
107	27.05.11	1956	m	p	B
108	27.05.11	1953	w	p	A2
109	01.06.11	1961	w	p	0
110	01.06.11	1945	m	p	0
111	01.06.11	1978	w	p	A2
112	01.06.11	1940	m	p	A2
113	02.06.11	1967	m	p	A2
114	02.06.11	1953	m	p	A2
115	07.06.11	1942	w	p	B
116	07.06.11	1970	m	p	B
117	07.06.11	1954	m	p	A2
118	07.06.11	1942	m	p	A2
119	07.06.11	1942	m	p	B
120	07.06.11	1955	m	p	A2
121	02.06.11	1984	w	s	A2
122	02.06.11	1987	w	s	A2
123	07.06.11	1983	w	s	B
124	08.06.11	1964	w	s	B
125	14.06.11	1936	w	p	A1
126	14.06.11	1949	m	p	B
127	14.06.11	1937	m	p	B
128	14.06.11	1921	w	p	A2
129	14.06.11	1918	w	p	0
130	14.06.11	1927	w	p	0
131	08.06.11	1952	w	p	A2
132	08.06.11	1954	m	p	A2
133	08.06.11	1945	m	p	A2
134	08.06.11	1964	w	p	A2
135	08.06.11	1935	m	p	A2
136	08.06.11	1928	w	p	B
137	08.06.11	1923	w	p	0
138	08.06.11	1941	w	p	A1
139	27.05.11	1985	m	s	B
140	02.06.22	1979	m	s	0
141	16.06.11	1935	m	p	A1
142	16.06.11	1932	m	p	0
143	16.06.11	1924	w	p	A2
144	16.06.11	1926	m	p	0
145	16.06.11	1937	w	p	A2
146	16.06.11	1935	w	p	B
147	20.06.11	1925	w	p	A1
148	20.06.11	1969	w	p	B
149	20.06.11	1934	m	p	0
150	20.06.11	1928	w	p	A1
151	20.06.11	1948	w	p	B
152	23.06.11	1971	m	p	A1
153	23.06.11	1931	w	p	0
154	23.06.11	1938	m	p	B
155	23.06.11	1948	w	p	A2
156	23.06.11	1924	m	p	A1
157	29.06.11	1934	w	p	B
158	29.06.11	1917	w	p	0
159	29.06.11	1927	m	p	B
160	29.06.11	1963	w	p	A2
161	29.06.11	1930	w	p	0
162	29.06.11	1934	m	p	A1

163	29.06.11	1924	m	p	A1
164	29.06.11	1935	m	p	0
165	29.06.11	1935	m	p	A1
166	12.07.11	1930	w	p	0
167	12.07.11	1933	w	p	0
168	12.07.11	1934	m	p	0
169	12.07.11	1928	w	p	0
170	12.07.11	1932	m	p	B
171	19.07.11	1935	w	p	B
172	19.07.11	1922	w	p	B
173	19.07.11	1930	m	p	B
174	19.07.11	1925	m	p	A2
175	14.07.11	1932	w	p	A2
176	15.07.11	1930	m	p	A2
177	13.07.11	1931	w	p	A2
178	13.07.11	1927	w	p	0
179	13.07.11	1934	m	p	A2
180	13.07.11	1936	w	p	0
181	14.07.11	1923	w	p	A2
182	14.07.11	1933	m	p	B
183	21.07.11	1921	w	p	B
184	21.07.11	1935	w	p	B
185	21.07.11	1932	m	p	B
186	21.07.11	1935	w	p	A2
187	25.07.11	1928	m	p	A2
188	25.07.11	1925	w	p	A2
189	25.07.11	1918	w	p	A2
190	08.08.11	1936	m	p	A2
191	08.08.11	1925	w	p	A2
192	30.03.11	1979	m	s	A1
193	31.03.11	1981	m	s	A1
194	31.03.11	1959	m	s	A1
195	31.03.11	1964	w	s	A1
196	01.04.11	1984	w	s	A1
197	05.04.11	1985	m	s	A1
198	05.04.11	1968	m	s	B
199	05.04.11	1988	w	s	A1
200	05.04.11	1982	m	s	A1
201	06.04.11	1988	m	s	A1
202	06.04.11	1977	m	s	A1
203	06.04.11	1973	m	s	A1
204	07.04.11	1961	m	s	A1
205	07.04.11	1963	m	s	A1
206	07.04.11	1973	m	s	A1
207	07.04.11	1969	w	s	A1
208	07.04.11	1974	m	s	A1
209	07.04.11	1984	m	s	A1
210	08.04.11	1970	w	s	A1
211	08.04.11	1959	m	s	A1
212	08.04.11	1984	m	s	A1
213	21.04.11	1986	w	s	A2
214	21.04.11	1990	m	s	A2
215	21.04.11	1981	m	s	A2
216	21.04.11	1984	m	s	0
217	21.04.11	1979	m	s	0
218	26.04.11	1942	m	p	A1
219	26.04.11	1985	m	p	A2
220	26.04.11	1939	m	p	0

221	27.04.11	1959	w	s	A1
222	27.04.11	1964	w	s	A1
223	27.04.11	1980	m	s	A1
224	27.04.11	1984	w	s	0
225	27.04.11	1967	w	s	0
226	28.04.11	1070	m	s	0
227	28.04.11	1957	m	s	0
228	28.04.11	1991	m	s	A1
229	28.04.11	1985	m	s	A1
230	28.04.11	1985	w	s	A1
231	28.04.11	1958	w	s	0
232	28.04.11	1988	m	s	0
233	02.05.11	1930	w	p	B
234	03.05.11	1984	m	s	A2
235	03.05.11	1960	m	s	A1
236	03.05.11	1964	m	s	A1
237	03.05.11	1979	m	s	A2
238	03.05.11	1979	m	s	0
239	03.05.11	1983	m	s	0
240	04.05.11	1978	w	s	0
241	04.05.11	1989	w	s	0
242	04.05.11	1990	m	s	A1
243	04.05.11	1967	w	s	A1
244	04.05.11	1963	w	s	A2
245	04.05.11	1977	m	s	A2
246	05.05.11	1987	m	s	0
247	05.05.11	1945	m	p	0
248	05.05.11	1942	w	p	0
249	05.05.11	1986	m	s	B
250	05.05.11	1987	m	s	B
251	05.05.11	1979	w	s	B
252	06.05.11	1991	m	s	B
253	06.05.11	1972	m	s	B
254	06.05.11	1972	m	s	B
255	06.05.11	1984	m	s	0
256	06.05.11	1956	m	s	0
257	06.05.11	1980	m	s	0
258	06.05.11	1971	w	s	0
259	06.05.11	1971	w	s	0
260	07.05.11	1967	w	s	B
261	07.05.11	1966	m	s	A2
262	07.05.11	1952	w	s	A2
263	07.05.11	1956	w	s	0
264	07.05.11	1971	m	s	0
265	07.05.11	1989	m	s	0
266	10.05.11	1962	w	s	0
267	10.05.11	1957	m	s	0
268	10.05.11	1986	m	s	0
269	10.05.11	1962	w	s	0
270	10.05.11	1984	m	s	A2
271	10.05.11	1955	w	p	A1
272	12.05.11	1932	m	p	B
273	12.05.11	1967	w	s	B
274	12.05.11	1984	m	s	B
275	12.05.11	1983	w	s	A2
276	12.05.11	1967	m	s	A2
277	12.05.11	1922	w	p	A1
278	12.05.11	1931	m	p	A2

279	12.05.11	1940	m	p	B
280	12.05.11	1956	m	p	B
281	12.05.11	1939	w	p	B
282	13.05.11	1986	m	s	A2
283	13.05.11	1970	w	s	A2
284	13.05.11	1988	w	s	B
285	13.05.11	1981	w	s	B
286	13.05.11	1984	m	s	B
287	13.05.11	1986	m	s	A2
288	13.05.11	1940	m	p	A1
289	13.05.11	1971	m	s	B
290	13.05.11	1980	w	s	B
291	13.05.11	1932	m	p	B
292	14.05.11	1951	w	p	0
293	14.05.11	1939	m	p	0
294	14.05.11	1933	w	p	0
295	14.05.11	1979	m	s	B
296	14.05.11	1962	w	s	B
297	17.05.11	1926	w	p	B
298	17.05.11	1930	m	p	0
299	17.05.11	1936	m	p	0
300	18.05.11	1950	m	p	A2
301	18.05.11	1932	m	p	A1
302	18.05.11	1932	m	p	B
303	18.05.11	1934	w	p	A1
304	18.05.11	1977	m	p	0
305	18.05.11	1949	m	p	A2
306	18.05.11	1969	w	p	0
307	18.05.11	1938	w	p	A1
308	18.05.11	1965	m	p	A1
309	18.05.11	1963	m	p	A1
310	19.05.11	1979	m	p	A1
311	19.05.11	1960	m	p	0
312	19.05.11	1928	w	p	0
313	19.05.11	1942	w	p	0
314	19.05.11	1976	m	s	B
315	19.05.11	1970	m	s	B
316	19.05.11	1985	m	s	B
317	20.05.11	1981	m	s	A2
318	20.05.11	1959	m	s	A2
319	20.05.11	1925	m	p	B
320	20.05.11	1933	m	p	0
321	20.05.11	1936	w	p	B
322	20.05.11	1952	m	p	A1
323	20.05.11	1950	m	p	0
324	20.05.11	1936	w	p	A2
325	20.05.11	1932	m	p	A2
326	20.05.11	1951	w	p	0
327	20.05.11	1948	w	p	A2
328	20.05.11	1932	w	p	A1
329	26.05.11	1968	m	s	A2
330	26.05.11	1911	w	p	0
331	26.05.11	1943	m	p	0
332	26.05.11	1944	m	p	B
333	26.05.11	1982	w	s	A2
334	26.05.11	1976	w	s	A2
335	26.05.11	1945	m	p	A2
336	26.05.11	1953	m	p	B

337	26.05.11	1954	m	p	B
338	26.05.11	1935	w	p	B
339	26.05.11	1939	w	p	B
340	26.05.11	1927	w	p	B
341	31.05.11	1981	m	p	A2
342	31.05.11	1940	m	p	A2
343	31.05.11	1949	w	p	B
344	31.05.11	1940	w	p	B
345	31.05.11	1936	w	p	B
346	31.05.11	1986	m	p	B
347	31.05.11	1964	m	p	A2
348	31.05.11	1945	m	p	B
349	31.05.11	1989	w	p	B
350	31.05.11	1940	m	p	B
351	03.06.11	1983	m	p	B
352	03.06.11	1944	w	p	B
353	03.06.11	1943	w	p	B
354	03.06.11	1970	m	s	A2
355	06.06.11	1939	m	p	A2
356	09.06.11	1935	w	p	A1
357	09.06.11	1933	m	p	A1
358	09.06.11	1930	m	p	A2
359	09.06.11	1934	m	p	0
360	09.06.11	1936	w	p	B
361	10.06.11	1951	m	p	A2
362	10.06.11	1931	m	p	0
363	10.06.11	1922	w	p	A1
364	10.06.11	1927	m	p	A1
365	14.06.11	1920	m	p	A1
366	14.06.11	1927	m	p	A2
367	14.06.11	1939	m	p	A2
368	14.06.11	1934	w	p	A1
369	14.06.11	1925	w	p	0
370	14.06.11	1924	w	p	0
371	14.06.11	1937	w	p	B
372	15.06.11	1961	w	p	A2
373	15.06.11	1934	w	p	A1
374	15.06.11	1929	w	p	0
375	15.06.11	1924	w	p	A1
376	16.06.11	1931	m	p	0
377	16.06.11	1931	m	p	0
378	16.06.11	1924	w	p	B
379	16.06.11	1985	m	p	B
380	16.06.11	1928	m	p	A2
381	16.06.11	1926	w	p	A2
382	17.06.11	1931	m	p	A1
383	17.06.11	1925	w	p	A1
384	17.06.11	1932	m	p	A2
385	17.06.11	1933	m	p	A1
386	17.06.11	1932	m	p	0
387	17.06.11	1929	w	p	0
388	21.06.11	1944	m	p	A2
389	21.06.11	1952	w	p	A2
390	21.06.11	1964	w	p	A2
391	21.06.11	1934	w	p	A1
392	21.06.11	1950	m	p	B
393	21.06.11	1936	w	p	B
394	28.06.11	1934	w	p	0

395	28.06.11	1932	m	p	0
396	28.06.11	1934	w	p	A1
397	28.06.11	1930	m	p	A1
398	28.06.11	1931	w	p	A1
399	28.06.11	1935	m	p	A2
400	28.06.11	1931	w	p	A2
401	28.06.11	1936	w	p	B
402	22.06.11	1936	m	p	A1
403	22.06.11	1936	w	p	A1
404	22.06.11	1922	w	p	A2
405	22.06.11	1943	w	p	B
406	22.06.11	1931	m	p	0
407	30.06.11	1920	w	p	A1
408	30.06.11	1933	m	p	A1
409	30.06.11	1922	w	p	A1
410	30.06.11	1935	m	p	A1
411	30.06.11	1926	w	p	B
412	30.06.11	1952	m	p	B
413	30.06.11	1995	m	p	B
414	30.06.11	1928	w	p	0
415	01.07.11	1932	w	p	0
416	01.07.11	1935	m	p	0
417	01.07.11	1933	m	p	0
418	01.07.11	1927	m	p	A2
419	01.07.11	1935	m	p	A1
420	01.07.11	1925	w	p	A1
421	01.07.11	1936	m	p	B
422	01.07.11	1935	w	p	0
423	04.07.11	1920	w	p	A2
424	04.07.11	1929	m	p	B
425	04.07.11	1928	w	p	A1
426	04.07.11	1935	w	p	A1
427	05.07.11	1969	w	p	A2
428	05.07.11	1988	m	p	A2
429	05.07.11	1977	w	p	A2
430	07.07.11	1933	m	p	A2
431	07.07.11	1980	m	p	B
432	06.07.11	1932	m	p	A2
433	06.07.11	1927	m	p	A2
434	06.07.11	1985	m	p	A2
435	06.07.11	1933	w	p	A2
436	30.07.11	1933	m	p	B
437	30.07.11	1923	w	p	B
438	30.07.11	1935	w	p	B
439	30.07.11	1926	w	p	B
440	30.07.11	1933	m	p	B
441	02.08.11	1934	m	p	A2
442	04.08.11	1930	m	p	B
443	04.08.11	1934	m	p	A2
444	04.08.11	1927	w	p	B
445	04.08.11	1913	w	p	B
446	06.08.11	1933	m	p	A2
447	06.08.11	1932	m	p	B
448	06.08.11	1920	w	p	A2
449	10.08.11	1930	w	p	A2

50							1	5	39
51							1	3	28
52							2	8	265
53							1	6	71
54							1	5	34
55	4	9	558	2	7	138			
56	2	8	289	3	6	88	4	8	304
57							1	7	143
58							1	6	79
59	2	5	42	1	3	8			
60	1	5	35	1	3	8			
61	2	7	138	1	5	36	1	6	71
62							3	8	278
63							1	5	35
64	3	8	296	2	8	274	2	7	145
65	3	8	277	1	5	32			
66	3	7	150	1	5	38	2	7	137
67							1	7	135
68	1	5	35	1	1	1	2	5	41
69							2	8	273
70	3	7	152	2	4	26	1	5	35
71	4	8	304	3	7	150	4	8	302
72							1	3	8
73	5	8	350	2	7	134			
74	1	5	35	1	3	7			
75							4	8	304
76							2	8	266
77							2	6	74
78							1	6	68
79	1	6	68	1	5	36	1	4	17
80	2	7	138	2	6	82	2	8	274
81	3	7	150	2	6	74	3	6	86
82	2	7	162	1	5	34			
83	1	1	1	1	2	3			
84	1	6	71	1	4	19			
85							1	2	3
86	3	9	550	4	7	174	1	5	39
87							1	4	17
88	2	9	530	2	7	134	2	5	38
89	1	6	67	1	5	35	1	4	19
90	2	7	138	1	6	66			
91	2	7	134	1	5	31			
92	1	3	8	0	0	0	1	4	19
93							1	4	15
94	2	7	145	1	5	32			
95	1	5	31	1	4	19			
96	3	10	1064	5	9	608	2	5	49
97	4	7	188	3	5	56	3	5	56
98							2	4	22
99	3	7	152	1	5	35			
100	2	7	138	1	4	16			
101	5	10	1132	5	9	620	4	9	564
102	4	6	84	1	4	20	1	2	3
103							1	4	16
104							1	5	35
105	3	7	152	2	4	26			
106	1	5	35	1	3	7			
107	4	8	304	1	4	16			

224	3	6	92	3	5	48	4	6	100
225	3	8	280	3	6	86	5	8	332
226	4	7	180	3	6	80	2	6	84
227	3	7	152	2	4	26	3	5	56
228							3	6	86
229							5	8	332
230							4	8	316
231	4	7	176	2	5	42	2	5	44
232	5	8	356	3	8	280	5	9	580
233	3	6	88	1	4	19			
234							2	5	42
235							3	6	56
236							1	4	19
237							4	8	304
238	4	9	596	3	8	280	4	7	180
239	2	5	42	1	2	3	1	5	33
240	4	8	308	2	6	76	1	4	19
241	4	7	176	3	5	48	4	7	164
242							4	9	596
243							2	7	138
244							4	8	308
245							4	8	308
246	4	8	348	2	6	88	4	7	180
247	3	6	92	4	6	84	5	9	620
248	4	6	100	2	5	44	3	7	152
249	4	9	316	2	6	76			
250	4	8	308	2	6	84			
251	4	8	286	1	5	35			
252	5	9	356	2	6	70			
253	2	6	73	1	2	3			
254	4	9	564	1	5	36			
255	3	7	156	1	5	36	1	5	36
256	3	6	92	2	4	28	1	4	19
257	3	7	156	2	6	76	1	5	40
258	2	6	84	2	4	21	1	3	7
259	5	9	684	4	8	340	3	7	152
260	3	8	284	1	6	72			
261							1	2	8
262							3	7	152
263	3	5	60	2	4	32	1	4	24
264	2	4	26	1	3	11	1	3	12
265	4	7	180	1	5	35	2	6	74
266	3	5	56	2	3	13	3	5	35
267	2	4	28	1	3	12	1	3	11
268	2	5	42	1	3	8	5	8	364
269	3	5	56	2	3	18	1	4	19
270							1	6	79
271							1	5	19
272	3	7	152	1	4	11			
273	4	7	176	2	4	26			
274	1	6	79	1	4	16			
275							3	6	88
276							3	7	156
277							5	9	680
278							3	5	48
279	4	7	164	2	4	22			
280	3	5	56	1	3	8			
281	2	5	50	1	3	11			

282							1	5	23
283							3	7	56
284	4	7	180	3	5	56			
285	2	6	76	1	3	7			
286	4	9	564	1	5	39			
287							2	5	41
288							1	3	9
289	3	8	296	1	3	8			
290	3	8	300	2	6	76			
291	4	7	176	2	5	41			
292	3	5	56	1	3	11	1	3	11
293	3	6	92	1	2	3	2	3	14
294	3	9	540	3	7	172	3	6	92
295	2	5	52	1	3	8			
296	3	7	156	2	4	18			
297	2	4	26	1	3	8			
298	1	3	12	1	2	4	1	2	4
299	3	6	86	2	4	18	2	3	17
300							1	6	80
301							1	2	4
302	2	4	32	1	2	4			
303							2	5	56
304	3	6	92	1	4	20	1	4	20
305							2	5	44
306	3	6	80	1	4	16	2	5	41
307							3	5	48
308							2	5	44
309							2	4	26
310							1	4	19
311	2	5	42	1	3	8	1	4	19
312	1	4	23	1	2	3	2	3	10
313	3	6	92	1	5	39	1	4	19
314	3	7	150	2	4	42			
315	2	5	48	1	2	4			
316	2	5	50	1	3	7			
317							4	7	188
318							3	6	92
319	1	5	40	1	2	4			
320	3	7	172	4	7	152	2	5	44
321	4	6	116	2	5	38			
322							3	5	56
323	3	6	92	1	3	7	2	4	21
324							4	6	116
325							1	3	9
326	4	5	68	1	5	49	2	5	38
327							1	5	79
328							1	3	8
329							3	5	56
330	2	6	82	1	5	39	3	6	88
331	4	6	116	2	6	74	2	5	56
332	1	6	72	3	4	22			
333							3	6	86
334							3	6	88
335							1	5	40
336	1	2	5	1	1	1			
337	4	7	176	2	3	10			
338	1	5	40	1	3	10			
339	1	4	19	1	2	4			

50							1	4	19
51							1	1	1
52							1	6	67
53							1	5	35
54							1	5	39
55	3	7	150	1	6	71			
56	4	8	302	3	8	294	6	9	701
57							2	6	73
58							3	8	277
59	1	4	19	0	0	0			
60	1	3	11	1	1	1			
61	2	7	145	1	5	35	3	7	149
62							1	7	135
63							1	4	19
64	3	10	1046	3	9	504	2	7	137
65	1	7	135	1	4	16			
66	1	6	71	1	4	19	2	8	273
67							2	6	73
68	1	5	35	1	1	1	2	7	137
69							2	7	137
70	3	8	278	2	6	74	2	6	74
71	4	9	560	3	9	534	4	10	1072
72							1	3	8
73	3	9	549	2	7	137			
74	1	4	19	0	0	0			
75							3	7	146
76							2	6	74
77							3	7	150
78							2	6	81
79	2	7	138	1	5	35	1	4	19
80	4	8	302	2	7	146	4	8	302
81	3	10	1094	2	7	146	3	8	277
82	3	6	86	2	5	42			
83	1	5	32	1	1	1			
84	2	6	73	1	3	8			
85							1	3	8
86	3	8	278	3	8	278	2	6	74
87							1	4	19
88	3	9	536	3	7	150	2	5	42
89	3	6	86	2	5	42	2	5	42
90	2	6	74	1	4	16			
91	1	6	67	1	3	8			
92	0	0	0	0	0	0	2	5	42
93							1	4	19
94	3	5	54	1	3	11			
95	3	7	150	2	5	42			
96	4	10	1168	5	10	1188	3	6	86
97	4	7	174	2	4	26	4	6	110
98							1	2	5
99	3	6	88	2	5	38			
100	3	7	152	1	5	35			
101	8	10	1820	6	10	1228	6	9	708
102	4	7	180	2	5	42	1	2	3
103							1	1	1
104							1	5	35
105	3	6	86	1	4	16			
106	1	3	11	0	0	0			
107	2	6	73	1	2	3			

224	4	7	174	4	6	110	4	8	143
225	4	7	174	3	5	53	4	9	557
226	6	9	702	5	8	350	4	6	110
227	4	7	174	2	4	25	4	6	110
228							2	5	26
229							5	8	350
230							5	8	350
231	4	6	110	2	4	25	2	4	41
232	5	9	606	4	7	142	3	9	590
233	2	5	41	1	1	1			
234							2	5	41
235							3	6	86
236							2	5	41
237							5	8	350
238	6	8	446	4	7	174	6	9	702
239	2	4	25	0	0	0	2	4	21
240	5	8	350	3	6	85	2	5	42
241	5	7	222	2	5	41	6	8	446
242							6	9	702
243							2	5	41
244							5	8	352
245							5	8	350
246	5	8	350	3	5	53	7	9	894
247	6	8	414	3	6	86	8	10	1790
248	5	8	349	3	6	85	5	8	349
249	4	7	142	1	4	19			
250	2	4	25	1	2	3			
251	3	5	53	1	3	11			
252	4	7	174	1	4	19			
253	1	4	19	0	0	0			
254	3	5	53	1	3	8			
255	3	5	54	2	5	41	1	3	11
256	4	6	110	1	4	19	2	5	41
257	5	8	350	4	6	109	5	7	221
258	2	5	41	1	4	19	1	2	4
259	7	9	900	6	9	702	5	8	349
260	2	5	41	1	3	8			
261							1	2	4
262							3	5	54
263	3	6	77	2	4	25	3	5	54
264	1	3	8	2	2	3	2	4	25
265	4	7	173	1	4	19	4	7	174
266	3	5	53	1	4	19	3	5	54
267	3	5	53	1	2	4	2	4	25
268	1	3	11	1	1	1	9	12	5588
269	2	5	41	1	3	11	2	5	41
270							3	5	53
271							1	8	19
272	4	7	174	1	5	35			
273	3	6	85	1	3	7			
274	1	3	19	1	2	4			
275							4	6	110
276							6	9	446
277							9	11	3572
278							3	5	54
279	4	6	110	1	4	19			
280	3	5	53	1	4	16			
281	2	5	41	1	3	8			

282							3	5	53
283							5	7	226
284	4	7	173	1	4	19			
285	2	5	41	1	1	1			
286	5	8	350	2	5	41			
287							3	6	85
288							1	3	9
289	3	5	53	1	3	7			
290	4	7	174	1	4	19			
291	3	6	85	1	5	35			
292	5	8	350	2	5	41	2	4	25
293	4	7	173	1	1	1	2	4	25
294	7	10	1406	4	7	173	6	9	701
295	2	4	25	1	1	1			
296	3	5	53	1	1	1			
297	1	4	19	1	2	3			
298	2	5	41	1	3	8	1	3	8
299	4	7	173	1	5	35	2	5	41
300							4	6	110
301							1	3	8
302	2	4	25	1	1	1			
303							4	6	109
304	5	7	222	3	6	85	4	6	109
305							3	6	85
306	2	5	41	1	3	8	5	8	348
307							3	6	85
308							3	6	85
309							1	4	19
310							3	5	53
311	2	5	41	1	3	8	4	6	109
312	1	3	11	1	1	1	2	4	25
313	4	7	173	2	5	41	2	5	41
314	5	7	222	3	5	53			
315	2	4	25	1	1	1			
316	2	5	41	1	2	3			
317							6	8	446
318							5	7	222
319	1	4	19	1	1	1			
320	6	9	702	5	8	350	3	5	54
321	4	7	173	1	4	19			
322							3	6	85
323	3	5	53	1	2	4	2	5	41
324							5	8	222
325							1	3	11
326	5	8	350	4	7	173	4	7	173
327							4	7	173
328							1	3	8
329							4	7	174
330	6	8	445	4	7	174	7	10	1406
331	5	8	350	3	6	86	3	5	54
332	3	6	86	1	5	35			
333							5	8	349
334							6	8	446
335							4	7	173
336	1	3	8	0	0	0			
337	5	8	350	1	4	16			
338	2	5	41	1	2	4			
339	1	4	19	0	0	0			

50							1	4	21
51							1	1	1
52							1	6	67
53							1	5	35
54							1	5	35
55	3	7	150	1	6	67			
56	4	9	1070	5	9	606	3	10	1061
57							1	6	67
58							1	7	135
59	1	4	16	0	0	0			
60	1	4	16	1	1	1			
61	3	10	1061	2	8	265	3	8	278
62							3	7	150
63							1	5	35
64	3	9	533	3	9	534	3	8	277
65	2	7	137	1	3	8			
66	2	8	265	1	6	67	4	8	302
67							2	6	73
68	1	6	66	0	0	0	2	10	1033
69							2	7	137
70	2	9	522	2	7	138	3	7	150
71	5	10	1120	3	10	1046	4	10	1072
72							1	3	8
73	3	10	1061	2	7	138			
74	1	3	8	0	0	0			
75							3	8	277
76							1	6	71
77							4	7	174
78							3	7	149
79	2	9	522	1	6	67	1	5	35
80	3	10	1062	3	9	534	4	9	558
81	6	10	1214	4	9	557	4	8	302
82	2	6	74	1	5	35			
83	1	5	35	1	1	1			
84	2	6	73	1	3	8			
85							1	3	11
86	4	10	1070	2	10	1058	3	8	294
87							1	3	11
88	3	9	534	2	8	266	3	6	86
89	4	8	304	2	6	73	2	6	74
90	2	7	138	1	4	19			
91	2	6	74	1	4	16			
92	1	1	1	0	0	0	2	6	74
93							1	5	35
94	2	7	138	1	3	11			
95	2	6	74	3	7	150			
96	7	10	1408	7	10	1408	3	7	150
97	7	9	894	5	8	350	5	8	352
98							1	4	19
99	2	7	138	1	5	35			
100	2	7	138	1	5	35			
101	8	10	1820	8	10	1820	5	9	620
102	3	9	536	2	9	529	1	5	35
103							1	1	1
104							1	5	35
105	2	7	138	1	3	7			
106	1	4	16	1	1	1			
107	1	6	67	1	2	3			

224	5	8	350	5	9	606	6	9	702
225	6	9	702	3	7	149	5	9	613
226	5	8	352	4	7	176	5	7	224
227	5	9	606	3	6	85	5	8	350
228							2	5	25
229							4	8	298
230							4	8	302
231	5	8	350	2	4	25	3	8	277
232	6	10	1184	5	9	606	7	10	1408
233	2	6	73	0	0	0			
234							2	4	25
235							3	6	86
236							2	6	73
237							5	7	222
238	7	9	894	5	8	350	6	9	704
239	3	8	277	1	2	3	4	6	109
240	7	9	896	6	9	702	6	8	445
241	7	9	896	4	8	301	6	9	702
242							6	9	704
243							3	5	53
244							5	8	344
245							5	8	350
246	8	10	1794	6	9	701	7	10	1406
247	3	10	1045	5	8	349	7	10	1405
248	4	10	1069	6	9	702	5	9	606
249	4	7	173	1	3	11			
250	2	5	41	1	2	3			
251	3	5	54	1	3	11			
252	5	7	222	1	3	8			
253	1	3	8	0	0	0			
254	3	6	85	1	2	3			
255	5	8	350	2	5	41	4	7	173
256	6	8	446	4	7	173	2	4	25
257	7	10	1406	5	8	350	8	10	1790
258	5	8	350	3	6	101	1	2	4
259	8	10	1796	7	9	900	6	8	446
260	4	6	109	1	2	4			
261							1	2	4
262							3	5	54
263	7	9	797	3	6	85	5	8	349
264	5	7	221	4	7	173	5	8	349
265	4	7	174	1	4	35	4	7	173
266	6	8	445	3	6	85	5	7	221
267	6	8	445	1	3	8	3	5	53
268	2	5	41	1	1	1	10	13	10076
269	4	7	173	1	4	19	2	5	41
270							2	5	42
271							1	3	11
272	4	7	174	1	4	19			
273	3	8	278	0	0	0			
274	1	4	19	1	2	6			
275							5	7	221
276							5	8	350
277							8	11	2796
278							3	5	54
279	4	7	174	1	4	19			
280	3	6	85	1	2	8			
281	2	5	41	1	2	3			

282							3	5	53
283							5	7	222
284	3	6	86	1	3	16			
285	2	4	25	0	0	0			
286	5	8	350	2	5	41			
287							3	5	53
288							1	3	4
289	3	6	85	1	2	3			
290	4	6	110	1	3	19			
291	3	6	85	1	4	18			
292	8	10	1790	6	8	445	3	5	53
293	5	8	349	1	5	35	4	6	109
294	7	10	1408	5	8	350	8	10	1789
295	2	5	41	1	1	1			
296	4	6	109	1	1	1			
297	3	6	85	1	3	8			
298	5	8	349	3	6	85	2	5	41
299	5	8	350	1	4	19	3	6	85
300							4	6	110
301							1	4	16
302	3	7	149	1	2	3			
303							4	7	174
304	8	10	1790	6	9	701	5	8	350
305							5	8	349
306	5	8	349	2	5	41	5	8	333
307							3	6	85
308							2	5	41
309							2	4	25
310							3	5	53
311	4	7	173	2	4	25	5	8	349
312	3	6	85	1	2	3	2	4	25
313	5	8	349	2	5	41	3	5	53
314	5	8	350	2	5	41			
315	3	5	53	1	1	1			
316	2	5	41	1	1	1			
317							6	8	445
318							4	7	173
319	1	4	19	1	1	1			
320	8	10	1536	8	10	1534	4	7	174
321	5	8	349	1	4	16			
322							3	5	53
323	4	7	173	1	3	8	3	6	85
324							5	7	221
325							1	4	16
326	8	10	1534	7	10	1405	6	9	702
327							3	5	53
328							1	2	3
329							3	6	85
330	5	7	222	3	6	86	4	6	110
331	6	9	702	5	8	317	8	9	1278
332	3	7	149	1	4	19			
333							4	7	173
334							6	9	702
335							4	7	301
336	1	3	8	0	0	0			
337	5	7	222	1	2	3			
338	2	6	72	1	1	1			
339	2	4	25	0	0	0			

7 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Spannagl für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Nutzung der Einrichtung und der Materialien der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie im Klinikum Großhadern.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer Dr. med. Georg Wittmann, der mich mit sehr viel fachlicher Kompetenz an die Thematik herangeführt hat und den Werdegang der Arbeit mit unendlicher Geduld und Humor begleitet hat.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie im Klinikum Großhadern für die praktische und moralische Unterstützung während der Zeit der Laborarbeit bei manchen langen Abenden und Nächten im Labor.

Besonderer Dank gilt meiner lieben Kollegin Anna Oßwald für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die Motivation die letzten fünf Jahre über.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während der Zeit meines Studiums und der Durchführung der Dissertation.

Desweiteren danke ich Thomas Bachmair, der mich beim Umgang mit meinem PC spielerisch ein paar Level weitergebracht hat.

Zu guter Letzt und ganz besonders danke ich meinem Mann Georg für die jahrelange liebevolle Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit und die unermüdliche Motivation besonders zum Ende hin. Danke für alles!

Eidesstattliche Versicherung

Hennig geb. Weingandt, Andrea

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Nachweismethoden und Normwerte für Isoagglutinine beim Menschen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.07.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand